HAL
open science

Etude des interactions entre les cellules dendritiques pulmonaires murines et Bacillus anthracis

Aurélie Cleret

To cite this version:

Aurélie Cleret. Etude des interactions entre les cellules dendritiques pulmonaires murines et Bacillus anthracis. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00139077

HAL Id: tel-00139077

https://theses.hal.science/tel-00139077v1

Submitted on 29 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École Doctorale Chimie et Science du Vivant
Université Joseph Fourier
Grenoble 1

Unité Interactions hôte-pathogène
Département de Biologie des Agents Transmissibles
Centre de Recherches du Service de Santé des Armées

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

Spécialité : VIROLOGIE, MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE

Présentée par **Aurélie CLERET**

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Joseph Fourier

Étude des interactions entre les cellules dendritiques pulmonaires murines et **Bacillus anthracis**

Thèse dirigée par Dominique VIDAL et Jean-Nicolas TOURNIER

Soutenue le 02 mars 2007

Jury :

M. Jean-Claude BENSA	Président
M. Karim VERMAELEN	Rapporteur
M. Pierre GOOSSENS	Rapporteur
M. Jean-Nicolas TOURNIER	Directeur des travaux
M. Dominique VIDAL	Directeur de thèse

« Audentes fortuna juvat »

Je voudrais tout d'abord remercier tous les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie tout particulièrement Dominique Vidal pour m'avoir accueillie au département de biologie des agents transmissibles durant ces 4 années.

Je souhaite aussi remercier Jean-Claude Bensa pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Votre présence est un honneur.

Je remercie surtout Karim Vermaelen et Pierre Goossens pour avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs.

À mon grand désarroi, une thèse ne porte qu'un seul nom d'auteur ! Et pourtant, un grand nombre de personnes ont participé à cette petite « œuvre ». Voici donc une longue liste de remerciements à toutes les personnes qui ont tant compté pour moi durant ces 4 années (trop courtes malgré tout !!!).

Dans un premier temps je voudrais remercier de tout coeur mon directeur de travaux et (co-)directeur de thèse, Jean-Nicolas, sans qui ce manuscrit et tout ce qu'il comporte ne serait pas ce qu'il est. Merci de m'avoir accueillie si chaleureusement dans ton équipe. Merci de tout ce savoir que tu n'hésites pas à transmettre et pour cette bonne humeur permanente dont tu arrives (si facilement !) à faire preuve. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue même dans les moments de doutes. Merci aussi pour ta patience car il en aura fallu pour finir ce manuscrit ! Bref merci de m'avoir encadrée pendant ces 4 années (ont-elles été trop longues ou trop courtes ?...).

Merci Anne pour ton aide précieuse, tes conseils éclairés et ton soutien. Nos longues discussions sur la vie, la science et l'avenir vont beaucoup me manquer !

Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Cette aventure partagée avec toi a été passionnante et tu resteras pour moi un exemple à suivre ! Merci aussi à Roland sans qui je n'aurais probablement jamais connu Boston. Thank's a lot!

Merci Jacques parce que c'est aussi (beaucoup) grâce à toi que j'ai pu participer à ce fabuleux congrès de Boston ! Merci pour toutes ces discussions scientifiques dont tu connais si bien les ficelles ! Sans toi je ne serais pas allée jusqu'ici avec autant d'entrain !

Merci aussi à Emma car sans toi je n'aurais pas connu ce laboratoire et ces gens formidables. Reste comme tu es, ta bonne humeur est un vrai bol d'air frais ! Je te souhaite bonne route dans ton nouveau labo.

Je remercie aussi :

Yves et Didier pour leur bonne humeur et pour avoir ouvert une superbe animalerie A2 (…juste pour moi ?!). Bon courage pour la suite de l'aventure DBAT-A2 !

Valérie pour sa gentillesse, félicitation pour la petite Marine qui nous a rejoint ! Toutefois reviens nous vite car le désordre commence à s'immiscer en Immunobio ! Paulette pour sa gentillesse et pour sa disponibilité (même dans les cas les plus urgents !). Françoise, heureusement que tu passes encore de temps en temps pour t'occuper de nos petites spores ! Corinne et Annick sans qui le laboratoire ne fonctionnerait pas si bien.

Les deux David de la BA pour leur aide précieuse, le tout dans la bonne humeur, merci aussi à Alex (l'Italie nous a volé la coupe !!). Lucie pour sa disponibilité, bon courage pour la suite.

Alexandra pour son aide technique et ses conseils précieux. Bonne continuation chez toi, en Israël. Fabienne et Claire du PLATIM (ENS, Lyon) pour leur aide technique, leur disponibilité et leur bonne humeur.

Jean-François (le roi du tri cellulaire !) pour sa disponibilité, sa bonne humeur et ses conseils.

Audrey pour son sourire permanent. En rappel de nos longues journées passées au cytomètre... Bon courage à toi aussi pour la suite et félicitation pour le petit bout de chou à venir. Fred pour nos longues discussions sur l'avenir dans les couloirs. Julien pour sa bonne humeur. Bon courage pour la suite de ta thèse.

Merci à toutes les personnes du département de biologie des agents transmissibles pour leur accueil et tous les moments passés ensembles. Je suis là depuis 4 ans et je ne vous connais que trop peu !

Je pense aussi à Olivier et Gaby qui sont loin de France mais toujours dans mon coeur. Bon courage à vous deux pour votre retour dans nos belles contrées.

Je voudrais aussi remercier toutes les petites souris (blanches ou noires, gentilles ou hargneuses) qui ont participé (de leur plein gré ?) à l'élaboration de ma thèse (enfin… je souhaite surtout me faire pardonner !!!).

Mais dans tous ces remerciements (je sais qu'il y en a trop mais je ne peux m'en empêcher !) les personnes qui ont le plus compté durant ma thèse sont sans nul doute mes proches. Merci à mes parents et à ma sœur pour m'avoir « supportée » durant toutes ces années, mais aussi pour avoir accepté de me voir si peu. Merci aussi à Aïgun pour ses câlins et ses ronronnements si rassurants.

Enfin et surtout (car cette thèse lui est dédiée), je voudrais remercier de tout mon cœur JP, car plus que quiconque, c'est grâce à toi que je suis parvenue à tenir au cours de ces années passées et je ne conçois pas les années à venir sans toi. Merci pour avoir surmonté l'épreuve à mes côtés et merci d'être là avec moi, à chaque instant.

Sommaire

Sommaire I

Glossaire V

Introduction Bibliographique ..... *- 1 -*

Chapitre I ..... *- 2 -*

1. Agent pathogène et cycle naturel ..... *- 5 -*

1.1. Caractéristiques morphologiques : bacille et spore ..... - 5 -

1.2. Cycle biologique ..... - 7 -

1.3. Écologie ..... - 7 -

2. Les facteurs majeurs de virulence ..... *- 9 -*

2.1. La capsule ..... - 9 -

2.1.1. Caractéristiques ..... - 9 -

2.1.2. Synthèse ..... - 9 -

2.2. Les toxines ..... - 11 -

2.2.1. Aspects généraux ..... - 11 -

2.2.2. Caractéristiques structurales ..... - 12 -

2.2.2.1. **L'antigène protecteur, PA** ..... - 12 -

2.2.2.2. **Le facteur œdématogène, EF** ..... - 13 -

2.2.2.3. **Le facteur létal, LF** ..... - 14 -

2.3. Mécanisme d'internalisation des toxines ..... - 15 -

2.3.1. Récepteurs cellulaires ..... - 15 -

2.3.2. Formation du pore ..... - 16 -

2.4. Modes d'action des toxines ..... - 19 -

2.4.1. La toxine létale ..... - 19 -

2.4.1.1. **LT et mort cellulaire** ..... - 19 -

2.4.1.2. **Effets de LT sur les fonctions cellulaires** ..... - 22 -

2.4.2. La toxine oedémateuse ..... - 23 -

2.5. Régulation de l'expression des gènes majeurs de virulence ..... - 25 -

3. Formes cliniques de la maladie, prophylaxie et vaccins ..... *- 27 -*

3.1. Forme cutanée ..... - 27 -

3.2. Forme gastro-intestinale ..... **- 28 -**
3.3. Forme pulmonaire ..... **- 29 -**
3.4. Prophylaxie et thérapeutique ..... **- 30 -**
3.5. Vaccins ..... **- 31 -**
3.5.1. Les vaccins entiers ..... - 31 -
3.5.1.1. **Le vaccin vivant atténué de Louis Pasteur** ..... - 31 -
3.5.1.2. **Le vaccin Sterne à base de spores d'une souche atténuée** ..... - 32 -
3.5.1.3. **Le vaccin russe** ..... - 32 -
3.5.2. Les vaccins acellulaires ..... - 33 -
3.5.2.1. **Le vaccin anglais** ..... - 33 -
3.5.2.2. **Le vaccin américain** ..... - 33 -
3.5.3. Les vaccins en développement ..... - 34 -
3.6. L'immunothérapie passive ..... **- 34 -**

Chapitre II ..... ***- 36 -***

1. Organisation générale du système respiratoire ..... ***- 37 -***
1.1. Les voies aériennes supérieures ..... **- 37 -**
1.2. Les voies aériennes inférieures ..... **- 39 -**

2. Organisation histologique et fonctionnelle du système immunitaire des voies aériennes inférieures ..... ***- 39 -***
2.1. Les cellules épithéliales pulmonaires ..... **- 39 -**
2.1.1. Les cellules épithéliales bronchiques ..... - 39 -
2.1.2. Les cellules épithéliales alvéolaires ..... - 41 -
2.2. Les macrophages pulmonaires ..... **- 42 -**
2.2.1. Origine et caractérisation des macrophages pulmonaires ..... - 42 -
2.2.1.1. Origine ..... - 42 -
2.2.1.2. Caractérisation chez la souris ..... - 45 -
2.2.1.3. Caractérisation chez l'homme ..... - 46 -
2.2.2. Fonctions ..... - 46 -
2.2.2.1. Phagocytose et élimination des éléments alvéolaires ..... - 46 -
2.2.2.2. Contrôle de l'homéostasie pulmonaire ..... - 47 -
2.2.2.3. Recrutement cellulaire ..... - 49 -
2.3. Les cellules dendritiques ..... **- 50 -**
2.3.1. Origines et fonctions générales ..... - 50 -
2.3.2. Localisation et caractérisation générale ..... - 52 -
2.3.2.1. Caractérisation chez la souris ..... - 52 -
2.3.2.2. Caractérisation chez l'homme ..... - 54 -
2.3.3. Cellules dendritiques et PRR ..... - 55 -

2.3.4. Les cellules dendritiques pulmonaires - 58 -
2.3.4.1. Les DC pulmonaires chez le rat - 58 -
2.3.4.2. Les DC pulmonaires chez la souris - 59 -
2.3.4.3. Les DC pulmonaires chez l'homme - 61 -
2.3.5. Fonctions des DCpulm dans la réponse immune primaire aux antigènes inhalés - 63 -
2.3.5.1. Recrutement des DC au sein des poumons - 63 -
2.3.5.2. Capture de l'antigène et migration jusqu'aux ganglions lymphatiques - 65 -
2.3.5.3. Régulation de l'activation des DCpulm - 66 -
2.3.5.4. Induction d'une réponse pulmonaire protectrice et polarisation de la réponse Th par les DCpulm - 67 -
2.4. Cellules recrutées en condition de non homéostasie - 70 -

Chapitre III - 72 -

1. B. anthracis et armes biologiques - 73 -

2. Physiopathologie du charbon d'inhalation - 74 -
2.1. Premières études et aspects cliniques chez les rongeurs - 75 -
2.1.1. Physiopathologie chez le cobaye - 75 -
2.1.2. Physiopathologie chez la souris - 76 -
2.2. Données anatomopathologiques chez les primates non-humains : - 79 -
2.3. Données anatomopathologiques chez l'homme : - 79 -

3. Modèle actuel du charbon d'inhalation - 81 -
3.1. Charbon d'inhalation : phases précoces de l'infection - 81 -
3.2. Inhibition de la réponse immune adaptative et diffusion du pathogène - 83 -

Résultats - 84 -

Objectifs - 85 -

Résultats - 87 -

1. Caractérisation des sous-populations de phagocytes du tissu pulmonaire (Article II) - 88 -

2. Étude de la propagation des spores de B. anthracis lors des phases précoces d'une infection par inhalation (Article I) - 89 -
2.1. Cinétiques d'infection des populations cellulaires des différents compartiments pulmonaires aux temps précoces de l'infection - 89 -
2.2. Contacts DCpulm – pathogène au cours des phases précoces de l'infection - 90 -

2.3. Cinétique de diffusion du pathogène jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques ..... - 90 -

3. Etude des effets des toxines sécrétées par B. anthracis *sur les DCpulm isolées ex vivo (Article II)* ..... *- 91 -*

3.1 Effets des toxines sur la maturation des DCpulm ..... - 91 -

3.2 Effets des toxines sur la sécrétion de cytokines par les phagocytes pulmonaires ..... - 92 -

Discussion - Perspectives ..... *- 95 -*

1. Les DCpulm constituent le « cheval de Troie » des spores de B. anthracis *dans la forme pulmonaire de la maladie* ..... *- 97 -*

1.1. Passage de la barrière épithéliale alvéolaire ..... - 97 -

1.2. Diffusion du pathogène jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques ..... - 99 -

1.3. Recrutement de DCpulm et de monocytes dans l'espace alvéolaire au cours des phases avancées de l'infection ..... - 100 -

2. Les toxines sécrétées lors de l'infection inhibent les fonctions des DCpulm et des phagocytes pulmonaires ..... *- 101 -*

2.1. LT inhibe la maturation des DCpulm ..... - 101 -

2.2. Les toxines modifient le profil de sécrétion de cytokines par les phagocytes pulmonaires ..... - 101 -

3. Perspectives ..... *- 103 -*

Références Bibliographiques ..... *- 106 -*

Références ..... *- 107 -*

Annexes ..... *- 123 -*

Annexe I ..... *- 124 -*

Annexe II ..... *- 125 -*

Glossaire

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
ANTXR	*Anthrax toxin receptor*
BDCA	*Blood derived DC antibody*
CaM	Calmoduline
CCL	*CC-chemokine ligand*
CCR	*CC-chemokine receptor*
CD	Cluster de différenciation
cDC	DC conventionnelles
CEB	Cellule épithéliale bronchique
c-JNK	*c-Jun N-terminal kinase*
CMG2	*Human capillary morphogenesis protein* 2
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CREB	*cAMP response element-binding*
CXCL	*CXC-chemokine ligand*
CXCR	*CXC-chemokine receptor*
DAMP	*Danger-associated molecular pattern*
DC	Cellule dendritique
DCm1/2	DC myéloïde de type 1/2
DCMO	DC dérivées de la moelle osseuse
DCpulm	DC pulmonaire
DC-SIGN	*DC-specific ICAM-grabing non-integrin*
EF	Facteur oedématogène
ERK	*Extracellular-signal regulated kinase*
ET	Toxine oedémateuse
GFP	*Green fluorescent protein*
GM-CSF	*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*
HLA	*Human leucocyte antigen*
i.n.	intra-nasal
i.p.	intra-péritonéal
i.t.	intra-trachéal
i.v.	intra-veineux
iDC	DC interstitielles
IDO	*Indoleamine 2,3-dioxygenase*
IFN	Interféron
IL	Interleukine

LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LC	Cellules de Langerhans
LF	Facteur létal
LPS	Lipopolysaccharide
LRP6	*Low-density-lipoprotein receptor-related protein 6*
LT	Toxine létale
MΦpulm	Macrophage pulmonaire
MA	Macrophage alvéolaire
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
M-CSF	*Macrophage-colony stimulating factor*
MI	Macrophage interstitiel
MKK	*Mitogen-activated protein kinase kinase*
MO	Moelle osseuse
moDC	DC dérivées des monocytes
NADPH	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced*
NF-$_\kappa$B	*Nuclear factor-$_\kappa$B*
NO	*Nitric oxide* / Oxyde nitrique
PA	Antigène protecteur
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
PDC	DC plasmacytoïde
PGA	Acide γ-D-glutamique
PGD_2	Prostaglandine D_2
PGE_2	Prostaglandine E_2
PKA	Protéine kinase A
PKR	*dsRNA-dependent protein kinase*
PLA2	Phospholipase A2
PNN	Polynucléaire neutrophile
PRR	*Pattern recognition receptor*
TEM8	*Tumor endothelial marker* 8
TGF-β	*Transforming growth factor-β*
Th	Cellule T *helper*
TLR	*Toll-like receptor*
TNF-α	*Tumor necrosis factor-α*
Treg	Cellule T régulatrice
VCAM	*Vascular cell adhesion molecule*

Introduction Bibliographique

Chapitre I

« Bacillus anthracis »

La maladie du charbon est une anthropozoonose connue depuis l'Égypte pharaonique : elle est probablement responsable d'une des sept grandes plaies qui s'abattirent sur le pays au temps de Moïse (Exode, VII-XII). Durant l'Antiquité, Virgile (70-19 av. J.-C.) fait référence à la maladie dans les *Géorgiques* (Dirckx, 1981). En 302, Eusèbe (265-340) décrit une épidémie qu'il désigne sous le nom d'« *anthrax* » en observant les viscères noirs sur les cadavres d'animaux (*anthrakos* en grec signifie charbon). Au Moyen-Âge, la maladie est connue sur tout le continent européen et principalement en Grande-Bretagne où elle reçoit le nom de « *black bane* ».

Au XIXème siècle, les recherches tendent à caractériser et à décrire l'agent pathogène responsable de la maladie. La présence de « bâtonnets » ou « filaments » dans le sang ou les organes des individus infectés est toujours observée sans pouvoir prouver l'implication de ces éléments dans l'infection charbonneuse. En 1850, Casimir-Joseph Davaine (1812-1882) observe lui aussi ces « petits corps filiformes » ; treize ans plus tard il démontre l'origine bactérienne de la maladie du charbon (Davaine, 1863). C'est Robert Koch (1843-1910) qui, en 1873, identifia et caractérisa l'agent étiologique responsable de la maladie. Koch nomme le pathogène *Bacillus anthracis* selon la classification systématique bactérienne alors établie par le microbiologiste Ferdinand Cohn (Koch, 1876).

En 1879, Charles Chamberland (1851-1908) observe au cours de ses travaux l'existence d'un état réfractaire chez les animaux guéris d'une première atteinte du charbon ou d'une inoculation antérieure. Chamberland est alors directeur adjoint du laboratoire de Louis Pasteur et ses recherches l'amènent à obtenir des germes de *B. anthracis* à virulence atténuée induisant une forme bénigne de la maladie menant à cet état réfractaire (c'est le principe de l'immunisation). C'est en 1881 que Louis Pasteur (1822-1895), assisté de trois médecins, Roux, Chamberland et Joubert, réalise l'expérience de Pouilly-le-Fort (Figure 1) : la vaccination de moutons par une souche vivante atténuée (Pasteur *et al.*, 1881 ; Chamberland, 1883). Quinze jours après le deuxième rappel, les moutons vaccinés deviennent résistants à une infection par une souche virulente tandis que les moutons non vaccinés succombent tous rapidement. L'expérience a un éclatant succès et ouvre le début de l'ère de la vaccination.

Figure 1 : Représentation de l'expérience de Pouilly-le-Fort en mai 1881.

En 1890, Elie Metchnikoff (1845-1916) décrit les mécanismes de chimiotactisme et de phagocytose de spores de *B. anthracis* par des cellules sanguines qu'il nomme « macrophages », mécanismes qui seront à la base de la théorie de l'immunité cellulaire (Metchnikoff, 1890). Metchnikoff ne se doute alors pas que ces interactions phagocytes – *B. anthracis* seront par la suite au centre des études sur la pathogenèse de la maladie du charbon.

Au milieu du XXème siècle, deux découvertes importantes vont considérablement accélérer la compréhension de la maladie : l'isolement de la souche vaccinale vétérinaire Sterne et l'identification des toxines, facteurs de virulence de la bactérie. En 1937, Max Sterne (1905-1997) isole une souche atténuée acapsulée et stable (Sterne, 1937a ; Sterne, 1937b) qui confère une immunité anti-charbonneuse efficace. C'est à partir de cette souche atténuée Sterne que Smith, en 1961, parvient à isoler et à caractériser les trois facteurs constituant les toxines sécrétées par la bactérie : l'antigène protecteur, le facteur œdématogène et le facteur létal (tout d'abord nommés facteurs II, I et III, respectivement) (cf. § 2.2.) (Stanley et Smith, 1961).

1. Agent pathogène et cycle naturel

B. anthracis est une bactérie à Gram positif appartenent à la famille des *Bacillaceae*. Cette famille regroupe les bacrtéries sporulantes des genres *Bacillus* et *Clostridium* (Claus et Berkeley, 1980). *B. anthracis* est un membre du groupe *B. cereus* qui comprend également *B. thuringiensis*, *B. cereus stricto sensu*, *B. mycoides* et *B. weihenstephanensis* (Priest *et al.*, 2004).

1.1. Caractéristiques morphologiques : bacille et spore

Au cours de son cycle naturel, *B. anthracis* se présente sous deux formes : une spore résistante et infectieuse, et un bacille - ou forme végétative - permettant la multiplication de la bactérie (pour revue, (Mock et Fouet, 2001)).

B. anthracis est un bacille de 1,0 à 1,2 µm de diamètre sur 3 à 5 µm de longueur, immobile et capsulé. Les bacilles se présentent sous une forme isolée ou en chaînettes leur donnant l'aspect de "cannes de bambou" (Figure 2). La bactérie a une croissance optimale en conditions classiques aérobie ou anaérobie, à une température comprise entre 30 et 37°C et à un pH entre 7 et 7,4. Sur milieu gélosé riche (type gélose au sang), la bactérie forme des colonies larges, plates, rugueuses et à bords dentelés (type « rough » ou R), tandis que sur milieu enrichi en sérum et en présence de bicarbonate et de CO_2, le bacille synthétise sa capsule et les colonies deviennent petites, lisses et brillantes (type « smooth » ou S).

La bactérie est capable de former des endospores en conditions spécifiques : carence nutritionnelle, aérobie et température comprise entre 18 et 42°C. Le processus de sporulation des bactéries du genre *Bacillus* se décompose en 7 stades nécessitant 6 à 8 heures (Ryter, 1965 ; Stragier et Losick, 1996). La cellule végétative qui donnera naissance à la spore représente le stade 0. Le stade I correspond à la réplication de l'ADN en deux chromosomes et à leur ségrégation polaire. Au cours des stades II et III, une division cellulaire asymétrique conduit à la formation de deux compartiments cellulaires inégaux. Le plus petit est la pré-spore, localisée à un pôle de la bactérie, et le plus grand correspond à la cellule mère ou

sporange. A partir de ce stade, les deux compartiments possèdent leur propre matériel génétique et leur propre devenir. Les stades IV à VI correspondent à une succession d'apposition d'enveloppes autour de la pré-spore jusqu'à maturation complète de cette dernière. Ils donnent naissance à la spore avec ses propriétés de résistance à la chaleur, aux rayonnements et à une variété d'agents chimiques. Finalement, au stade VII, des enzymes lytiques détruisent le sporange ce qui permet la libération de la spore présentant une forme ovoïde et mesurant de 0,75 à 1 µm (Figure 2).

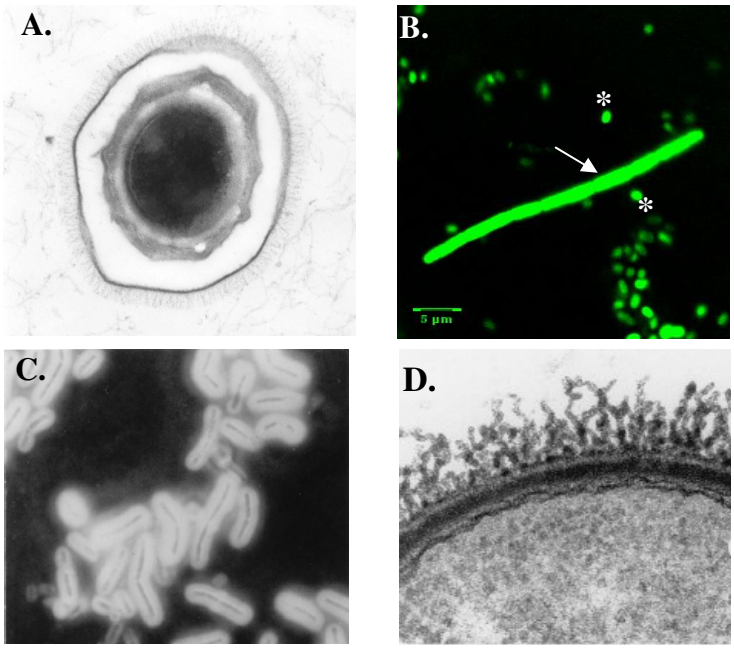


Figure 2 : ***A***, Structure de la spore de *B. anthracis* (souche Sterne, acapsulée/toxinogène) observée en microscopie électronique à transmission (MET) (Brochier G., Service d'imagerie, CRSSA) ; ***B***, Observation de spores (astérisque) et de bacilles en chaînette (flèche) de *B. anthracis* (souche p6gfp-Sterne) exprimant la gfp (*green fluorescent protein*) en microscopie confocale (Cleret A., Quesnel-Hellmann A., Mathieu J., Tournier J.N., microscope confocal Zeiss LSM510, PLATIM Lyon) ; ***C***, Culture de la souche CAF10 (capsulée/atoxinogène) observée en microscopie optique après coloration à l'encre de Chine. La capsule apparaît brillante (d'après (Mesnage *et al.*, 1998)) ; ***D***, Structure de la capsule de la forme végétative de *B. anthracis* (souche CAF10) observée en MET (d'après (Mesnage *et al.*, 1998)).

1.2. Cycle biologique

Le cycle de vie de *B. anthracis* nécessite l'infection d'hôtes mammifères. Schématiquement, les herbivores ingèrent des spores présentes dans le sol. Les spores entrent en phase de germination au sein de l'hôte pour donner naissance à la forme végétative de la bactérie. Les bacilles prolifèrent et produisent les principaux facteurs de virulence que sont la capsule et les toxines (cf. § 2.) ce qui va, *in fine*, conduire à la mort de l'hôte. Après la mort de l'animal, le sang charbonneux noir et incoagulable, caractéristique de la maladie, s'écoule par les orifices naturels. Les bacilles se retrouvent au contact de l'air et entament le processus de sporulation (Lindeque et Turnbull, 1994). Les spores persistent dans le sol jusqu'à un nouveau cycle d'infection.

L'homme peut être infecté après contact avec des animaux ou des peaux contaminés ou par ingestion de viande contaminée.

1.3. Écologie

Si la maladie du charbon n'a plus un impact majeur dans les pays développés, quelques foyers sont susceptibles d'apparaître occasionnellement. Ainsi, deux foyers ont été signalés en France au cours de l'année 1997 : l'un dans le Béarn (mort de 21 vaches dans 9 élevages, trois cas humains secondaires, un cas chez un chien) et l'autre en Savoie (mort d'une quarantaine de bovins, pas de cas humains) (Sylvestre, 2003). A l'inverse, l'infection est endémique dans les cheptels des pays de l'Est, du pourtour méditerranéen, de l'Asie du Sud Est, d'Afrique et d'Amérique du Sud. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime entre 100 000 et 200 000 cas humains par an.

Les risques de voir apparaître des cas de charbon chez l'homme et l'animal dans les pays développés sont liés à plusieurs facteurs (Tableau I). Tous ces éléments font que la maladie du charbon reste présente dans de nombreux pays et pourrait resurgir sporadiquement au sein de cheptels dans les pays développés.

Tableau I : Causes de la résurgence possible de la maladie du charbon dans les pays développés (d'après (Patra *et al.*, 1998)).

Domaine d'application	**Causes de la résurgence possible de la maladie du charbon**
Vétérinaire	abandon de la vaccination animale dans certaines régions
	méconnaissance de la maladie par les jeunes vétérinaires et les jeunes éleveurs
	réintroduction de certains rapaces comme les vautours, insensibles au charbon mais capables de disséminer les spores (principalement dans leurs fèces) et nourris avec des carcasses non contrôlées
Économique	raisons économiques qui conduisent à ne pas rechercher de manière systématique les causes de la mort d'animaux dans un cheptel
	non-enlèvement des carcasses par l'équarrisseur lors de mort non définie et, tout particulièrement en raison du coût, non-enlèvement des carcasses des petits ruminants
Social	reprise des abattages clandestins avec consommation familiale de la viande
	reprise des enfouissements clandestins dans certaines régions
	oubli de l'emplacement exact des "champs maudits"*

* « champs maudits » : emplacement de l'enfouissement de carcasses d'animaux contaminés.

2. *Les facteurs majeurs de virulence*

B. anthracis produit deux facteurs majeurs de virulence : une capsule et deux toxines, la toxine létale (LT, *lethal toxin*) et la toxine œdémateuse (ET, *edema toxin*).

2.1. La capsule

2.1.1. Caractéristiques

La capsule produite par *B. anthracis* est formée d'un polymère constitué d'acide γ-D-glutamique (PGA) (Hanby et Rydon, 1946). Elle est singulière car les capsules bactériennes sont généralement polyosidiques. Elle a aussi la particularité d'être composée de polymères linéaires présentant l'énantiomère D-glutamate uniquement, ce qui la rendrait peu immunogène (Maurer, 1965 ; Goodman et Nitecki, 1967). De plus, chez *B. anthracis*, le PGA présente des liaisons γ entre ses résidus et est ainsi résistant aux protéases qui ne clivent que les liaisons α-aminées des protéines (Candela et Fouet, 2006). Une élimination du plasmide portant les gènes de synthèse de la capsule diminue la virulence de la bactérie chez les herbivores et l'homme (souche Sterne). *In vivo*, la capsule permet à la bactérie de résister à la phagocytose et donc d'échapper au système immunitaire (Zwartouw et Smith, 1956 ; Makino *et al.*, 2002).

2.1.2. Synthèse

La synthèse de la capsule est gouvernée par l'opéron *capBCADE* situé sur le plasmide pXO2. Les enzymes de synthèse du PGA sont codées par les gènes *cap* (*capB*, *capC*, *capA* et *capE*) et par le gène *dep* (ou *capD*) (Candela et Fouet, 2005). Les fonctions des protéines CapB, CapC, CapA et CapE ont été étudiées par comparaison avec leurs homologues chez *Bacillus subtilis* (PgsB, PgsC, PgsAA et PgsE, respectivement) (Figure 3) (Ashiuchi *et al.*,

2001). PgsB est impliquée dans l'élongation du PGA et présente une activité ligase (Eveland *et al.*, 1997 ; Urushibata *et al.*, 2002). Les fonctions de PgsC ne sont pas encore bien définies, mais un mélange de PgsB et PgsC possède une activité ATPase, ainsi PgsC participerait à la synthèse du PGA (Urushibata *et al.*, 2002). Enfin, une comparaison d'alignement de séquence avec PgsAA suggère que CapA serait un transporteur de glutamate (Ashiuchi *et al.*, 2001). Le gène *dep* ou *capD* code pour une quatrième protéine, CapD (à l'origine appelée Dep) dont l'analyse de mutants a permis de montrer qu'elle était nécessaire à l'ancrage covalent du PGA au peptidoglycane (Candela et Fouet, 2005). Elle présente aussi une activité dépolymérase (Makino *et al.*, 2002) et joue donc un rôle dans la régulation de la taille de la capsule. Récemment, un nouveau peptide nécessaire à la synthèse du PGA et codé par le gène *capE* a été décrit (Candela *et al.*, 2005). Ce petit peptide CapE joue probablement un rôle structural en interagissant avec CapA.

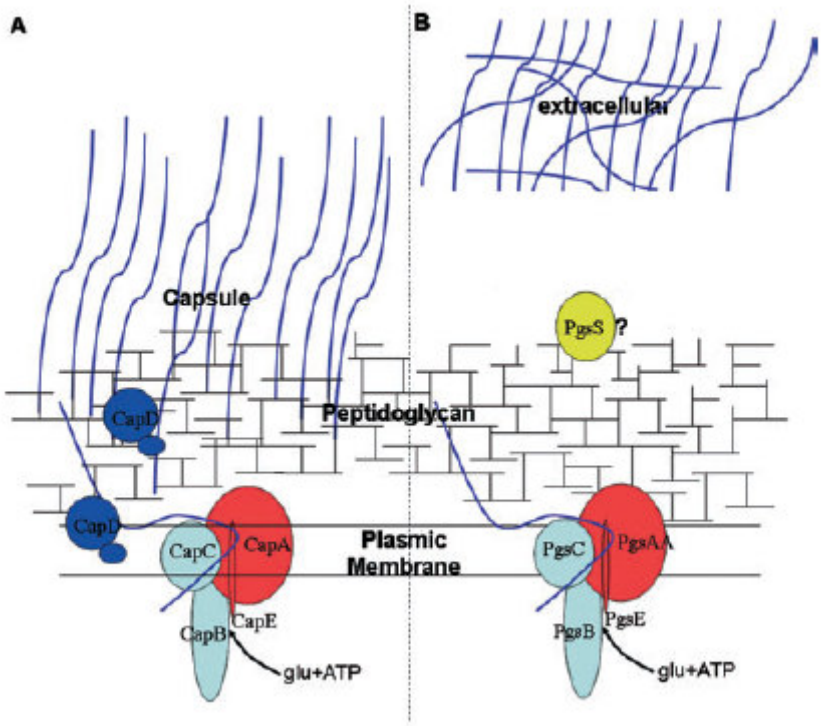


Figure 3 : Représentation schématique de la synthèse du PGA chez *B. anthracis* (***A***) et chez *B. subtilis* (***B***). Chez *B. anthracis* la capsule est ancrée à la membrane tandis que chez *B. subtilis*, la capsule est sécrétée (d'après (Candela et Fouet, 2006)).

2.2. Les toxines

2.2.1. Aspects généraux

Les toxines du charbon sont de type A/B où la sous-unité A (*activity*), représentée par les facteurs œdématogène ou létal, exerce l'activité enzymatique de la toxine, et la sous-unité B (*binding*), représentée par l'antigène protecteur, se lie aux récepteurs membranaires.

Depuis longtemps, les capacités protectrices de l'antigène protecteur (PA, *protective antigen*) sont connues : le nom de PA vient de l'immunité protectrice engendrée par une immunisation avec cette protéine (Gladstone, 1946 ; Wright *et al.*, 1954).

L'existence d'une substance toxique produite par la forme végétative de *B. anthracis* a été émise après les observations de Keppie et de Smith (Smith et Keppie, 1954 ; Keppie *et al.*, 1955 ; Smith *et al.*, 1955). Keppie *et al.* ont montré que la streptomycine guérit les cobayes d'une infection jusqu'à un certain seuil de concentration de bactéries dans le sang. Quand ce seuil est dépassé, les cobayes ne peuvent plus être guéris même si le nombre de bactéries est considérablement diminué (Keppie *et al.*, 1955). Smith *et al.* ont démontré la présence d'un facteur létal dans le plasma de cobayes morts de la maladie du charbon en injectant ce plasma par voie intra-péritonéale (i.p.) chez la souris ou le cobaye et en observant la mort des animaux 12 heures après l'injection (Smith *et al.*, 1955). Ils démontrent ainsi l'existence de substances toxiques sécrétées par les bactéries dans le sang.

Après purification du facteur III, nommé par la suite facteur létal (LF, *lethal factor*), l'action toxique de la toxine associée (PA + LF) a pu être testée et reconnue sur les modèles animaux (Stanley et Smith, 1961 ; Beall *et al.*, 1962). Plus récemment, il a été montré que la toxine participe à la virulence puisqu'une souche mutée pour le gène codant LF est beaucoup moins virulente chez la souris que la souche parentale Sterne (Pezard *et al.*, 1991). Il a aussi été montré qu'une injection de 100 µg de LT par voie intra-veineuse (i.v.) ou i.p. chez la souris induit des lésions de type hypoxique et la mort des animaux sans syndrome inflammatoire (Moayeri *et al.*, 2003). De même, chez le rat, la mort induite par l'injection i.v. de 100 µg de LT durant 24 heures ne résulte pas de la sécrétion de cytokines ni d'oxyde nitrique (NO) mais d'une hypotension (Cui *et al.*, 2004).

Une injection sous-cutanée du facteur œdématogène (EF, *edema factor*) associé à PA et formant la toxine oedémateuse, induit la formation d'un œdème (Stanley et Smith, 1961),

expliquant ainsi l'étymologie du nom « facteur œdématogène ». Une étude a récemment montré que ET s'avère hautement létal à plus faibles concentrations et plus rapidement que LT dans un modèle murin (Firoved *et al.*, 2005). Ainsi, ET induit de nombreuses lésions associées à la maladie du charbon. Ces lésions sont différentes de celles induites par LT et comprennent une hémorragie des ganglions lymphatiques et du tractus gastro-intestinal, ainsi qu'une nécrose de nombreux tissus incluant les organes lymphoïdes, la moelle osseuse, le cœur et les reins (Firoved *et al.*, 2005). Une étude a aussi montré que ET peut induire une nécrose tissulaire dans un modèle Zebrafish (Voth *et al.*, 2005).

2.2.2. Caractéristiques structurales

2.2.2.1. **L'antigène protecteur, PA**

La protéine PA (83 kDa) est codée par le gène *pagA* porté par le plasmide pXO1. Elle a été cristallisée en 1997 et présente 4 domaines distincts (Figure 4) (Petosa *et al.*, 1997). Le domaine 1 *N*-terminal contient le site de clivage protéolytique (au niveau du résidu 167), donnant naissance aux deux sous-unités PA_{20} et PA_{63} (Brossier et Mock, 2001). La portion du domaine 1' restante (résidus 168-258, associés à PA_{63}) correspond au site de fixation des facteurs létal et œdématogène (Petosa *et al.*, 1997). Les domaines centraux 2 (résidus 259-487) et 3 (résidus 488-596) sont respectivement impliqués dans la formation du pore/translocation des facteurs (Sellman *et al.*, 2001) et dans l'heptamérisation de PA_{63} (Mogridge *et al.*, 2001) (cf. § 2.3.2.). En *C*-terminal, le domaine 4 (résidus 597-735) présente peu de contacts avec les autres domaines et est impliqué dans la liaison de PA à ses récepteurs cellulaires (Little et Lowe, 1991) (cf. §2.3.1.).

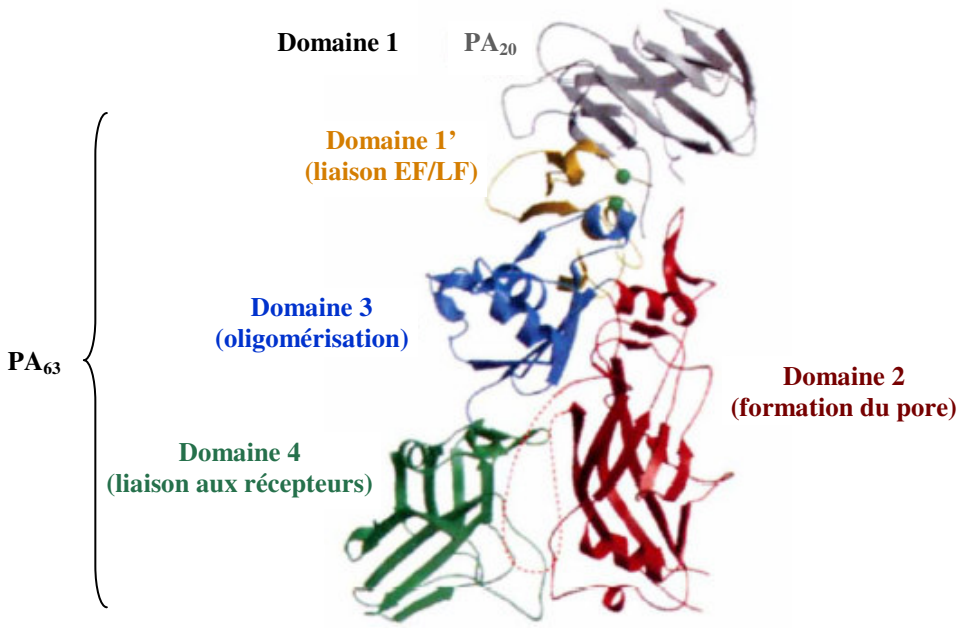


Figure 4 : Structure de l'antigène protecteur monomérique de *B. anthracis* (d'après (Petosa *et al.*, 1997)).

2.2.2.2. **Le facteur œdématogène, EF**

La protéine EF (89 kDa) est codée par le gène *cya* porté par le plasmide pXO1 (Robertson *et al.*, 1988). En 1982, Leppla *et al.* démontrent que EF est une adénylate cyclase, induisant une augmentation incontrôlée d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire chez les cellules eucaryotes (Leppla, 1982). La résolution de la structure cristalline de EF a montré qu'elle ne présentait pas d'homologie structurale avec les adénylates cyclases mammifères (Drum *et al.*, 2002). EF est composé de trois domaines globulaires (C_A, C_B, et le domaine hélical) et de trois boucles flexibles (switch A, B et C) (Figure 5*A*) (Drum *et al.*, 2002). Le domaine C_A, au niveau *N*-terminal, possède une forte homologie de séquence avec le domaine 1 du facteur létal (cf. § 2.2.2.3.) (Escuyer *et al.*, 1988 ; Bragg et Robertson, 1989). Cette région intervient dans la fixation à l'heptamère $[PA_{63}]^7$ (cf. § 2.3.2.) (Mourez *et al.*, 2002). Les interfaces des domaines C_A et C_B forment le site catalytique de la protéine. En *C*-terminal, le domaine hélical, lié à C_A *via* un *linker*, correspond au site de fixation de la calmoduline (CaM) (Labruyere *et al.*, 1990). Après fixation de la CaM, des modifications structurales au niveau des deux domaines C_A, C_B et des trois boucles flexibles A, B, C permettent la fixation du substrat ATP (Figure 5*B*) (Drum *et al.*, 2002 ; Mourez *et al.*, 2002).

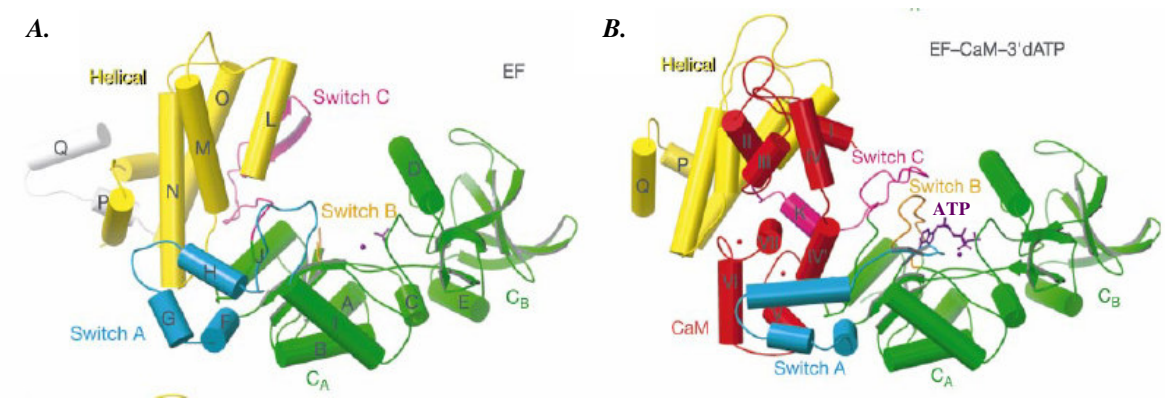


Figure 5 : Structures secondaires du facteur œdématogène de *B. anthracis* seul (***A***) ou du complexe EF CaM-ATP (***B***) (d'après (Drum *et al.*, 2002)).

2.2.2.3. **Le facteur létal, LF**

LF est une protéine de 90 kDa codée par le gène *lef* porté par le plasmide pXO1 (Bragg et Robertson, 1989). LF est une métalloprotéase contenant un motif HExxH de liaison au Zn^{2+} en *C*-terminal (résidus 686-690), motif présent sur le site actif de toutes les métalloprotéases (Klimpel *et al.*, 1994).

La structure cristallographique et l'étude de mutants [LF] montrent la présence de quatre domaines distincts (Figure 6) (Pannifer *et al.*, 2001). L'homologie de séquence avec le domaine C_A de EF et impliquée dans la liaison à l'heptamère $[PA_{63}]^7$ se situe au niveau *N*-terminal (résidus 27-262) et correspond au domaine 1 de LF (Arora et Leppla, 1993). Le domaine 2 de la protéine (résidus 263-297 et 385-550) forme une poche dans laquelle vient se fixer le peptide substrat. Le domaine 3 de LF est situé au sein du domaine 2 (résidus 298-384) et participe à la reconnaissance du substrat (Arora et Leppla, 1993 ; Pannifer *et al.*, 2001). Ce domaine semble correspondre à une duplication imparfaite de séquences du domaine 2 (Mourez *et al.*, 2002).

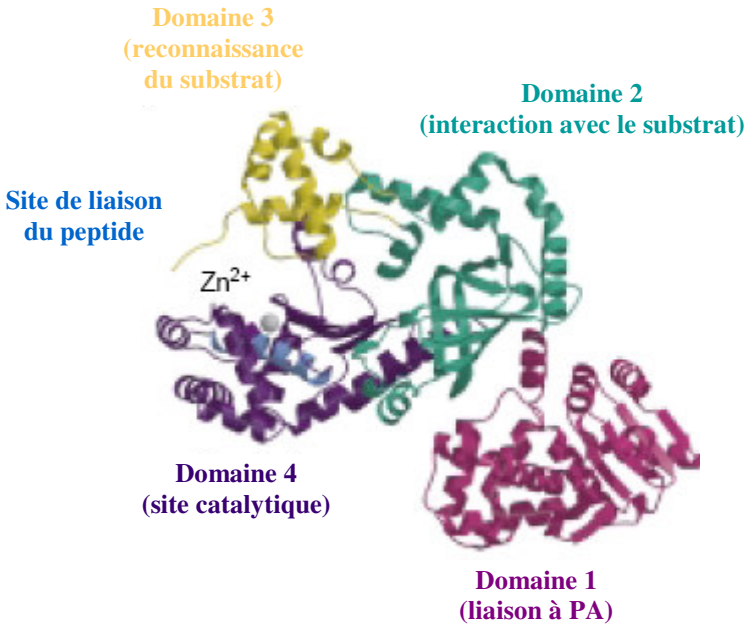


Figure 6 : Structure du facteur létal de *B. anthracis* (d'après (Mourez *et al.*, 2002)).

Le quatrième domaine est formé par le segment des résidus 551 à 777 et comporte le motif classique des métalloprotéases HExxH, site catalytique de LF (Kochi *et al.*, 1994 ; Menard *et al.*, 1996b). Les domaines 2, 3 et 4 forment un sillon spécifique au substrat (Pannifer *et al.*, 2001).

2.3. Mécanisme d'internalisation des toxines

Lorsque des cellules sont incubées avec les facteurs EF et LF seuls (en absence de PA), aucune cytotoxicité n'est observée. Différents acteurs sont effectivement impliqués dans l'internalisation des deux facteurs sécrétés par *B. anthracis*.

2.3.1. Récepteurs cellulaires

Deux récepteurs cellulaires de PA sont actuellement décrits : le marqueur TEM8 (*tumor endothelial marker* 8) ou ANTXR1 (*anthrax toxin receptor* 1) (Bradley *et al.*, 2001),

et la protéine CMG2 (*human capillary morphogenesis protein* 2) ou ANTXR2 (Scobie *et al.*, 2003). Les deux récepteurs possèdent un domaine transmembranaire de type I et un domaine conservé VWA (facteur von Willbrand de type A) extracellulaire possédant un motif MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) directement impliqué dans la liaison avec PA (Bradley et Young, 2003 ; Lacy *et al.*, 2004b). ANTXR1 est exprimé par les cellules épithéliales des organes constituants les sites d'entrée de *B. anthracis*, c'est à dire les poumons, la peau et le tractus intestinal (Bonuccelli *et al.*, 2005). ANTXR1 est aussi exprimé par les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains activées par la prostaglandine E2 (PGE2), médiateur lipidique sécrété par les cellules épithéliales alvéolaires (cf. § Chapitre II, 2.3.5.2.) (Riccobon *et al.*, 2006). De plus, des travaux récents ont montré que la surexpression d'ANTXR1 par une lignée de macrophages murins entraîne la mort des cellules par apoptose après incubation avec PA seul et de façon caspase 3-dépendante (Salles *et al.*, 2006). Cette cytotoxicité serait due à la formation de pores et à la libération de protéines lysosomales dans le cytosol. ANTXR2, quant à lui, est exprimé dans de nombreux tissus (Scobie *et al.*, 2003). Le rôle physiologique de ce récepteur dans la mort associée à LT a été démontré chez le rat (Scobie *et al.*, 2006).

Récemment, une nouvelle protéine nécessaire aux mécanismes d'endocytose des toxines a été identifiée, LRP6 (*low-density-lipoprotein receptor-related protein 6*) (Wei *et al.*, 2006). Cette protéine, impliquée dans la voie de signalisation Wnt importante dans la régulation de l'embry, est capable d'interagir avec les deux protéines-récepteurs de PA et joue le rôle de co-récepteur dans l'internalisation des toxines (Figure 7*A*).

De même, des travaux ont montré que des cellules n'exprimant pas ARAP3 (*Arf and Rho GTPase activating protein 3*), une protéine liant les phosphoinositides, deviennent résistantes à une intoxination (Lu *et al.*, 2004). Les liens entre ces différents éléments et leur participation dans l'internalisation des toxines restent encore à élucider.

2.3.2. Formation du pore

La liaison PA-récepteur induit le clivage de PA par une protéase cellulaire de type furine (Klimpel *et al.*, 1992), produisant un fragment soluble de 20 kDa (PA_{20}) et un fragment de 63 kDa (PA_{63}) associé aux récepteurs *via* son domaine *C*-terminal (Figure 7*A*). Plusieurs complexes PA_{63}-récepteur s'assemblent alors pour former un heptamère appelé pré-pore

($[PA_{63}]^7$) (Petosa *et al.*, 1997 ; Abrami *et al.*, 2003). L'heptamère peut lier jusqu'à trois molécules de EF et/ou LF (Mogridge *et al.*, 2002 ; Pimental *et al.*, 2004).

Les complexes toxines-récepteurs se localisent au niveau de rafts lipidiques et sont internalisés par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant (Figure 7*A*) (Abrami *et al.*, 2003). Ils sont ensuite associés aux endosomes précoces dont des régions multivésiculaires se détachent pour devenir des transporteurs intermédiaires ou *multivesicular bodies* (MVB) qui sont transportés le long de microtubules jusqu'à la région périnucléaire où ils fusionnent avec les endosomes tardifs (Abrami *et al.*, 2005).

La progression des vésicules depuis les endosomes précoces et jusqu'aux endosomes tardifs expose le pré-pore à un environnement de plus en plus acide (Friedlander, 1986 ; Menard *et al.*, 1996a ; Abrami *et al.*, 2004). L'acidification induit une modification conformationnelle au sein du domaine 2 des sept sous-unités PA_{63} de l'heptamère formant alors un pore (Lacy *et al.*, 2004a). La translocation des facteurs dans le cytosol à travers ce pore nécessite un dépliement complet des protéines (Krantz *et al.*, 2004). La différence de pH entre les endosomes et le cytosol est un facteur nécessaire dans le mécanisme de translocation de EF et LF (Krantz *et al.*, 2006).

Le rôle des récepteurs ANTXR1 et -2 dans la formation du pore a été démontré (Lacy *et al.*, 2004a ; Santelli *et al.*, 2004). Ainsi, un relâchement entre le récepteur et le domaine 2 de PA semble nécessaire à la formation du pore (pour revue, (Scobie et Young, 2005)), dissociation qui nécessite un pH différent selon que PA est associé à ANTXR1/TEM8 ou ANTXR2/CMG2 (Rainey *et al.*, 2005). EF reste associé à la membrane des endosomes tardifs et présente ainsi une activité concentrée au niveau peri-nucléaire (site de localisation des endosomes tardifs) tandis que LF est relargué dans le cytosol (Guidi-Rontani *et al.*, 2000 ; Dal Molin *et al.*, 2006).

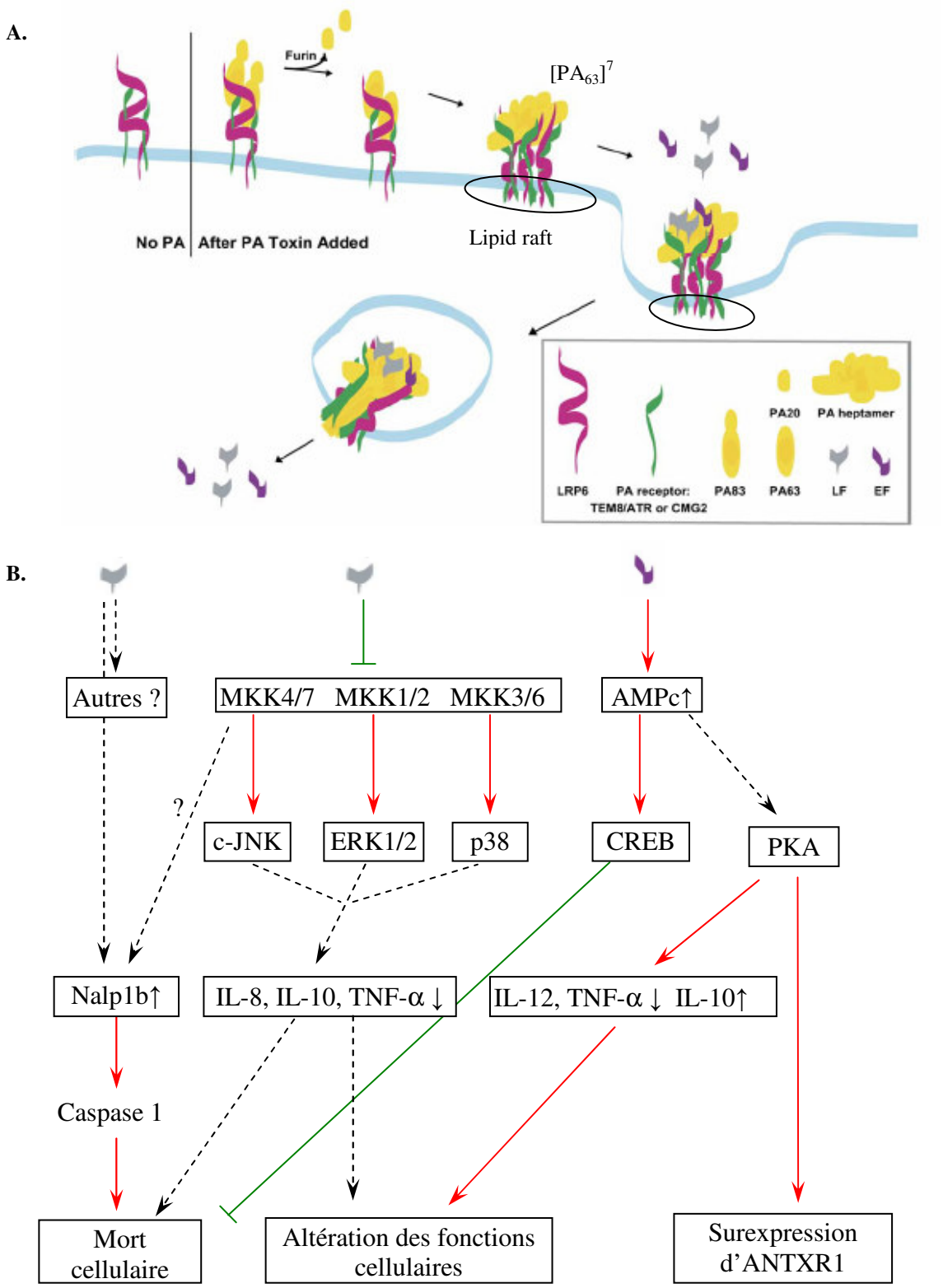


Figure 7 : Mécanismes d'internalisation et mode d'action intracellulaire des toxines : ***A***, acteurs de l'internalisation des toxines (d'après (Wei *et al.*, 2006)) ; ***B***, cibles intracellulaires du facteur létal et du facteur œdématogène (d'après (Banks *et al.*, 2006) et (Tournier *et al.*, 2007)).

2.4. Modes d'action des toxines

2.4.1. La toxine létale

Le facteur létal de *B. anthracis* est une métalloprotéase spécifique des *mitogen-activated protein kinase kinases* (MKK) (Figure 7*B*). LF clive ces enzymes entre la partie *N*-terminale et leur domaine catalytique (Duesbery *et al.*, 1998 ; Vitale *et al.*, 1998) *via* la reconnaissance d'une séquence partiellement conservée de la partie *C*-terminale des kinases (Chopra *et al.*, 2003). Les MKK sont des activateurs directs des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dans la cascade de signalisation intracellulaire connue sous le nom de « voie des MAPK ». Le domaine *N*-terminal des MKK est nécessaire à l'interaction et à la phosphorylation des MAPK, et le clivage protéolytique de ce domaine par LF bloque l'activation des MAPK (Duesbery *et al.*, 1998). LF inhibe ainsi les MKK 1, 2 (Duesbery *et al.*, 1998 ; Vitale *et al.*, 1998), 3 (Pellizzari *et al.*, 1999), 4, 6 et 7 (Vitale *et al.*, 2000). De ce fait, les trois voies majeures de signalisation en aval des MKK sont dérégulées : les voies ERK (*extracellular-signal regulated kinases*) -1 et -2, la voie c-JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et la voie p38 (Figure 7). Chacune de ces voies joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire (pour revue, (Dong *et al.*, 2002)).

2.4.1.1. **LT et mort cellulaire**

De grandes variations de sensibilité à la toxine létale entre différentes espèces ont été observées. En 1986, Friedlander *et al.* montrent que les macrophages péritonéaux de souris C3H/HeN sont rapidement lysés après une exposition d'une heure à la toxine létale tandis que des macrophages issus de certaines lignées cellulaires s'avèrent résistants (Friedlander, 1986). L'inhibition de la voie des MAPK ne semble cependant pas être impliquée dans la sensibilité des macrophages puisqu'il a été montré que l'internalisation du facteur létal, sa délivrance dans le cytosol (Friedlander *et al.*, 1993) et le clivage des MKK (Pellizzari *et al.*, 1999) sont des phénomènes retrouvés dans les deux cas de sensibilité des macrophages murins. Une étude a montré que LF active le protéasome dans le cytosol des macrophages murins,

conduisant à la dégradation de molécules essentielles pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et à la lyse des cellules (Tang et Leppla, 1999). Cette activation s'effectue en aval du clivage des MKK mais le mécanisme impliqué reste à déterminer. Il pourrait alors expliquer les différences de sensibilité des macrophages murins observées selon leur origine (Tableau II) (Friedlander, 1986 ; Singh *et al.*, 1989).

Tableau II : Sensibilité et résistance des différents types de macrophages murins en fonction de leurs origines

			références
Macrophages sensibles	Lignées cellulaires	J774A.1	(Singh *et al.*, 1989) (Park *et al.*, 2002)
		Raw264.7 (dérivés de BALB/c)	(Pellizzari *et al.*, 1999) (Popov *et al.*, 2002b)
	Macrophages péritonéaux	C3H/HeN	(Friedlander, 1986) (Friedlander *et al.*, 1993) (Kim *et al.*, 2003)
		BALB/c	(Pellizzari *et al.*, 1999)
	Macrophages dérivés de la MO[a]	BALB/c	(Park *et al.*, 2002)
Macrophages résistants	Lignées cellulaires	IC-21 (dérivés de C57BL/6)	(Singh *et al.*, 1989)
		MT2 (dérivés de BALB/c)	(Pellizzari *et al.*, 1999)
	Macrophages péritonéaux	A/J	(Friedlander *et al.*, 1993) (Pellizzari *et al.*, 1999)
		DBA/2J	(Pellizzari *et al.*, 1999)
		C57BL/6J	(Kim *et al.*, 2003)
	Macrophages dérivés de la MO[a]	C57BL/6J	(Park *et al.*, 2002)

[a] MO : moelle osseuse

Afin de comprendre les différences de sensibilité des macrophages murins, un facteur génétique a été recherché. Le locus *Ltxs1/Kif1C*, situé sur le chromosome 11, a été identifié dans le contrôle de la susceptibilité des souris à la toxine létale (Roberts *et al.*, 1998). Récemment, le gène directement impliqué a été identifié et s'avère lié au gène polymorphique *Nalp1b* (Boyden et Dietrich, 2006). Nalp1b est un composant-clé de l'inflammasome et un activateur de la caspase-1 (Figure 7*B*). Son activation induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1 et l'IL-18 et mène à la mort cellulaire (Tschopp

et al., 2003 ; Petrilli *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que la mort induite par LT peut être indépendante de l'inhibition de la voie des MAPK.

D'autres travaux chez la souris montrent que LF induit une mort par apoptose *via* des cibles intracellulaires directes ou indirectes. En 2002, Park *et al.* montrent pour la première fois que LT induit l'apoptose des macrophages activés dérivés de la moelle osseuse de souris BALB/c, directement *via* l'inhibition de la voie p38 MAPK (Park *et al.*, 2002). Dans le même temps, Popov *et al.* observent l'activation des caspases -1, -2, -3, -4, -6 et -8 dans des lignées de macrophages murins suite à une exposition à LT menant à l'apoptose de ces macrophages (Popov *et al.*, 2002b). L'activité pro-apoptotique de LT est aussi liée à sa capacité de supprimer les signaux de survie engendrés par l'engagement de TLR4 (*Toll-like receptor 4*) et médiés par la voie p38 MAPK qui active l'expression de gènes de survie *via* l'activation du *nuclear factor* (NF) -$_{\kappa}$B. En clivant les MKKs, et plus particulièrement les MKK3/6, LT bloque l'activation de la voie p38 MAPK et de NF-$_{\kappa}$B, conduisant à l'apoptose des macrophages (Figure 7*B*) (Park *et al.*, 2005). Une autre étude montre que LT inhibe l'expression de la GSK3β (*glycogen synthase kinase 3β*), une protéine impliquée dans la régulation positive de la survie cellulaire (Tucker *et al.*, 2003), mais ces travaux ne permettent pas d'exclure le rôle joué par l'inhibition de la voie des MAPK dans la mort cellulaire. LF semble donc avoir un effet direct sur la viabilité des macrophages murins. Plus récemment, une autre voie apoptotique induite par LT a été décrite impliquant l'activation de TLR4 par *B. anthracis via* l'activation de PKR (*dsRNA-dependent protein kinase*) (Hsu *et al.*, 2004). Enfin, un autre mécanisme de susceptibilité à LT a été proposé chez la souris : le TNF (*tumor necrosis factor*) -α, produit lors d'une infection, active les macrophages qui deviennent alors sensibles à la mort induite par LT (Kim *et al.*, 2003).

Les macrophages et les cellules endothéliales humaines présentent une sensibilité à la toxine létale qui se traduit par une mort par apoptose (Popov *et al.*, 2002a ; Kirby, 2004 ; Pandey et Warburton, 2004). Les données concernant la mort des cellules dendritiques humaines induite par LT sont discordantes. Deux études montrent que LT ne présente pas d'effets toxiques sur les cellules dendritiques humaines (Agrawal *et al.*, 2003) (Quesnel-Hellmann A., communication personnelle), tandis qu'une troisième observe une mort par apoptose très similaire à celle induite sur des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris C57BL/6 (Alileche *et al.*, 2005).

2.4.1.2. **Effets de LT sur les fonctions cellulaires**

Les effets de la toxine létale sur les fonctions cellulaires sont nombreux et ubiquitaires.

LT inhibe la production de radicaux oxygénés (ROS, *reactive oxygen species*) par les polynucléaires neutrophiles (PNN) humains (Crawford *et al.*, 2006) et bloque leur activation (Wright et Mandell, 1986) ainsi que leur recrutement par chimiotactisme (During *et al.*, 2005).

LT bloque la prolifération et la différentiation des monocytes humains (Kassam *et al.*, 2005). De plus, des travaux ont montré que les sécrétions de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-1β, produites par les macrophages murins activés, sont inhibées suite à une incubation avec LT (Pellizzari *et al.*, 1999 ; Erwin *et al.*, 2001). Une étude similaire sur des macrophages dérivés de monocytes humains confirment ces résultats (Popov *et al.*, 2002a). En 2004, Dang *et al.* montrent que LT inhibe l'activation de la protéine IRF-3 (*interferon-regulatory factor-3*) chez les macrophages humains et murins activés par du lipopolysaccharide (LPS) (Dang *et al.*, 2004). IRF-3 participe à l'induction transcriptionnelle de nombreuses cytokines et chimiokines. LT inhibe en fait un grand nombre de gènes impliqués dans la transduction du signal, la production d'enzymes ou encore dans le métabolisme protéique des macrophages (Comer *et al.*, 2005b). De même, la production de phospholipase A2 (PLA2) type IIA, une enzyme effectrice de la réponse immune innée avec une activité bactéricide produite par les macrophages alvéolaires, est inhibée lors d'une incubation avec LT chez le cobaye (Gimenez *et al.*, 2004). Tous ces phénomènes inhibent la réponse inflammatoire et favorisent la prolifération du pathogène lors des phases précoces de l'infection.

LT inhibe la réponse immune cellulaire et plus particulièrement la présentation des antigènes (Ag) par les cellules dendritiques murines dérivées de la rate en bloquant l'expression des molécules de co-stimulation et en inhibant la sécrétion de l'ensemble des cytokines (Agrawal *et al.*, 2003). A l'inverse, une étude similaire portant sur des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris BALB/c et C57BL/6 ne montre pas d'inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation et montre des effets sélectifs sur la sécrétion de cytokines avec une inhibition de la sécrétion de TNF-α et d'IL-10 mais pas de l'IL-12 (Tournier *et al.*, 2005). Chez l'homme, LT inhibe à la fois la maturation des cellules

dendritiques et la sécrétion de chimiokines telles que CXCL (*CXC-chemokine ligand*) 8 (ou IL-8), jouant un rôle prépondérant dans le recrutement des monocytes/PNN, ou encore CCL (*CC-chemokine ligand*) 2 et CCL5 jouant un rôle dans le recrutement des cellules T (Quesnel-Hellmann, communication personnelle). LT inhibe aussi la sécrétion d'IL-12, d'IL-10 et de TNF-α par les cellules dendritiques humaines à faibles concentrations (Quesnel-Hellmann, communication personnelle).

LT cible la réponse cellulaire en inhibant l'activation et l'expression de molécules de surface telles que le CD69 et CD25 (Paccani *et al.*, 2005), ainsi que la prolifération et la production de cytokines telle que l'IL-2 (Fang *et al.*, 2005) par les cellules T humaines. Une étude similaire menée chez la souris a montré que LT inhibe l'activation des lymphocytes T *in vivo* (Comer *et al.*, 2005a).

L'immunité humorale est aussi affectée. Des dysfonctionnements sévères sont observés à la fois chez l'homme et chez la souris sur les cellules B après intoxination avec LT. Leur prolifération en réponse à divers stimuli est fortement diminuée ainsi que leur capacité de production d'immunoglubuline (Ig) M (Fang *et al.*, 2006).

Enfin, LT augmente l'expression de la protéine membranaire VCAM (*vascular cell adhesion molecule*)-1 par les cellules endothéliales humaines activées, molécule responsable de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire (Steele *et al.*, 2005). Elle augmente aussi la perméabilité de la barrière endothéliale en modifiant la distribution des VE-cadhérines, molécules impliquées dans les jonctions adhérentes (Warfel *et al.*, 2005). LT engendre la lyse des hématies en présence de PNN (Wu *et al.*, 2003), inhibe la coagulation sanguine et supprime l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Kau *et al.*, 2005). Tous ces évènements pourraient être à l'origine des hémorragies et des effusions pleurales retrouvées cliniquement.

2.4.2. La toxine oedémateuse

En 1982, il est établi que EF est une adénylate cyclase calcium-calmoduline dépendante induisant une augmentation incontrôlée d'AMPc intracellulaire (Leppla, 1982 ; Leppla, 1984 ; Ulmer *et al.*, 2003). L'activité adénylate cyclase de EF est 1000 fois plus élevée que celle des adénylates cyclases eucaryotes (pour revue, (Banks *et al.*, 2006)).

Peu de travaux ont été réalisés sur les mécanismes d'action et le rôle de la toxine œdémateuse lors d'une infection par le bacille du charbon, probablement en raison des différences observées avec la toxicité médiée par LT, et sans doute aussi par la difficulté d'obtenir des quantités suffisantes de toxine purifiée pour des études *in vivo*. Cependant, dès 1985, une étude montre que ET est capable d'inhiber la phagocytose des bacilles par les PNN humains *in vitro* (O'Brien *et al.*, 1985). La toxine œdémateuse joue donc probablement un rôle plus important dans la physiopathologie de la maladie que ce que l'on pensait jusqu'alors. Par la suite, il a été montré que ET bloque l'activation des PNN (Wright et Mandell, 1986) ainsi que leur activité NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced*) oxidase (Crawford *et al.*, 2006).

ET modifie aussi les fonctions des cellules dendritiques murines en bloquant leur sécrétion de TNF-α et d'IL-12 après activation (Tournier *et al.*, 2005), et inhibe l'activation des cellules T humaines (Paccani *et al.*, 2005).

ET supprime l'agrégation plaquettaire confirmant son activité adénylate cyclase invasive (Alam *et al.*, 2006). Dans les phases tardives de la maladie, des bactéries sont présentes dans de nombreux tissus mais les mécanismes impliqués dans cette propagation sont mal connus. La modification du cytosquelette cellulaire induite par ET sur de nombreuses cellules de mammifères peut conduire à des jonctions serrées plus faibles et ainsi permettre une pénétration plus aisée de la bactérie dans les tissus (Hong *et al.*, 2005).

Dernièrement, une étude a montré que ET induit une augmentation de l'expression des récepteurs ANTXR1 et -2 dans des lignées de macrophages murins et du récepteur ANTXR2 dans des cellules dérivées de monocytes humains (Maldonado-Arocho *et al.*, 2006). Cette augmentation de l'expression des récepteurs à la surface des cellules favoriserait secondairement l'entrée des toxines.

Un autre travail a démontré que ET est aussi capable d'inhiber l'apoptose cellulaire induite par TLR4 *via* l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de CREB (*cyclic AMP response element-binding*), une molécule essentielle à la survie des macrophages (Park *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont permis de démontrer l'action synergique des deux toxines (ET et LT) *in vivo* pour la virulence (Pezard *et al.*, 1991) et *in vitro* pour inhiber les fonctions des cellules dendritiques murines (Tournier *et al.*, 2005). L'association des deux toxines agit donc

sur de nombreuses cibles et neutralise tous les compartiments cellulaires de l'immunité innée, affectant des étapes cruciales de la signalisation cellulaire (pour revue, (Baldari *et al.*, 2006)).

2.5. Régulation de l'expression des gènes majeurs de virulence

L'étude de la régulation des gènes chez *B. anthracis* se fait principalement par inactivation de gènes ou par comparaison avec des espèces du type *B. cereus* (Figure 8).

Le plus fort taux de transcription de l'opéron de synthèse de la capsule a lieu dans un milieu équilibré en CO_2/bicarbonate (Fouet et Mock, 1996). La température n'affecte pas directement la transcription de l'opéron, cependant elle influence probablement la synthèse de la capsule en agissant sur l'activité des enzymes de synthèse (Fouet et Mock, 1996). AcpA et AcpB, dont les gènes sont situés sur le plasmide pXO2, sont les deux activateurs transcriptionnels de l'opéron *capBCADE*. AcpA et AcpB sont eux-mêmes soumis à une régulation dirigée par la présence de CO_2, jouant le rôle de co-activateur, et de AtxA, une protéine trans-activatrice régulant la majorité des gènes de virulence de *B. anthracis* (Mignot *et al.*, 2003 ; Mock et Mignot, 2003).

Le plus fort taux de transcription des gènes des toxines a lieu à 37°C dans un milieu équilibré en CO_2/bicarbonate (Sirard *et al.*, 1994) et se situe à la phase exponentielle de croissance du micro-organisme (Mock et Mignot, 2003). AtxA est l'activateur de transcription des trois gènes codant les toxines (*pagA*, *lef* et *cya*) situés sur le plasmide pXO1 (Fouet et Mock, 2006). Le mécanisme exact de régulation des gènes est très complexe et implique d'autres molécules régulatrices dont AbrB qui réprime l'expression de AtxA (Strauch *et al.*, 2005).

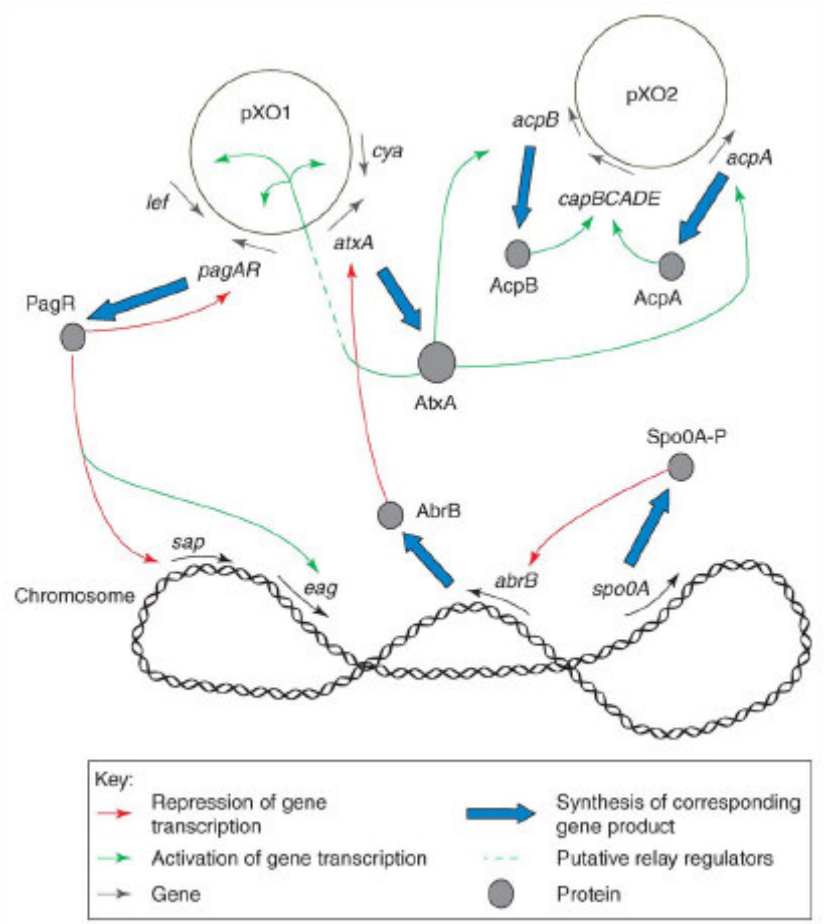


Figure 8 : Représentation schématique du système de régulation connu des gènes de virulence chez *B. anthracis* (d'après (Fouet et Mock, 2006)).

Les conditions optimales de croissance et de synthèse des facteurs de virulence de *B. anthracis* sont très proches des conditions rencontrées au sein de l'hôte.

3. Formes cliniques de la maladie, prophylaxie et vaccins

Trois formes cliniques de la maladie du charbon sont décrites chez l'homme. Elles sont regroupées en deux catégories : le charbon externe où les spores sont inoculées à travers la peau produisant la forme cutanée de la maladie et les charbons internes qui correspondent à une entrée de spores par inhalation ou par ingestion, donnant respectivement les formes pulmonaire et gastro-intestinale. Les trois formes sont potentiellement fatales mais les formes internes présentent un risque mortel beaucoup plus élevé.

3.1. Forme cutanée

La forme cutanée représente 95% des cas de charbon et correspond à une infection par le biais d'une plaie cutanée ou d'une piqûre d'insecte (pour revue, (Dixon *et al.*, 1999)). La période d'incubation est de 1 à 5 jours. La première phase correspond à la formation d'une papule qui, après 1 à 2 jours, se transforme en vésicule érythémateuse. Cette vésicule se rompt pour former un ulcère nécrotique qui devient noirâtre et forme alors l'escarre noire caractéristique de la forme cutanée de la maladie du charbon (Figure 9) (Kaufmann et Dannenberg, 2002).

Figure 9 : Forme cutanée de la maladie du charbon avec les escarres noires caractéristiques. Cas après exposition naturelle, Turquie (Kolbe *et al.*, 2006).

Il faut 2 à 6 semaines pour que la plaie cicatrise entièrement. La mortalité du charbon cutané est généralement inférieure à 1% mais peut atteindre 5 à 20% en absence de traitements (Shieh *et al.*, 2003). La forme cutanée est toujours accompagnée d'un œdème. Si la lésion s'étend jusqu'au réseau lymphatique, la bactérie atteint le flux sanguin et l'issue peut alors être fatale.

3.2. Forme gastro-intestinale

Appelée aussi « oropharyngée », cette forme correspond à une infection par ingestion de spores. La période d'incubation varie de 2 à 5 jours et les premiers symptômes sont souvent non spécifiques à savoir nausées, vomissements, fièvre et douleurs abdominales sévères. Des lésions intestinales avec des diarrhées se développent, les ganglions deviennent hémorragiques, une ascite peut se former et des escarres caractéristiques sont retrouvées au niveau de la paroi intestinale (Figure 10).

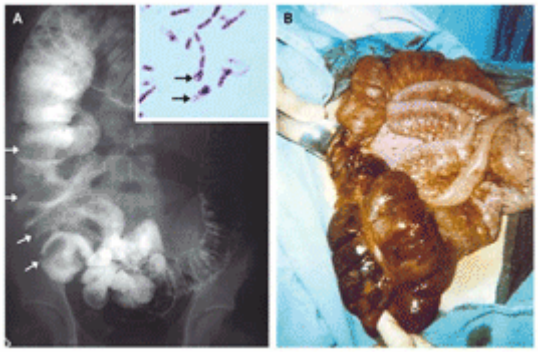


Figure 10 : Forme gastro-intestinale de la maladie du charbon. Cas après ingestion de viande de mouton contaminée, Liban. ***A***, Dilatation cæcale au lavement baryté ; la photo en haut à droite montre des bacilles Gram-positifs, immobiles et formant des spores (flèches) après mise en culture des ganglions mésentériques ; ***B***, aspect per opératoire du cæcum (Ghossain, 2006).

Moins fulgurante que la forme respiratoire, elle est cependant fatale dans 95% des cas chez les herbivores et dans plus de 50% des cas chez l'homme, la mort pouvant se produire dans les jours voire les heures suivant les premiers symptômes (Sirisanthana et Brown, 2002).

3.3. Forme pulmonaire

Le charbon pulmonaire correspond à une infection après inhalation de spores de *B. anthracis*. L'homme et les herbivores sont particulièrement sensibles à ce type d'infection. Si les cas humains étaient relativement fréquents au XIXème et au début du XXème siècle, touchant principalement les cardeurs de laine et les tanneurs, la forme pulmonaire est aujourd'hui associée à des cas sporadiques, les épidémies étant rarement dues à une exposition naturelle. En 1979, un accident dans une base militaire russe provoque la libération d'une grande quantité de spores de *B. anthracis* par aérosol, provoquant la mort de 68 personnes sur 96 cas, initialement déclarés comme des cas digestifs (Abramova *et al.*, 1993 ; Meselson *et al.*, 1994). Durant l'automne 2001 aux États-unis, l'envoi de lettres contaminées avec des spores de charbon a provoqué la mort de 5 patients ayant développé un charbon pulmonaire (sur 11 cas pulmonaires au total dont 8 diagnostics précoces) (Figure 11) (Bartlett *et al.*, 2002 ; Inglesby *et al.*, 2002). Le charbon pulmonaire est la forme clinique la plus fatale et la plus fulgurante (Borio *et al.*, 2001).

Les spores, mesurant 1 µm, atteignent les bronchioles et les alvéoles du système respiratoire. La période d'incubation est d'environ 6 jours mais peut atteindre 60 jours (Meselson *et al.*, 1994). Une première phase de manifestation clinique peut durer quelques jours avec des symptômes non spécifiques incluant des sensations de malaises, une toux non productive, de la fièvre, des douleurs rétro-sternales et des myalgies. En l'absence de traitement, une deuxième phase fulgurante liée à l'installation d'un état septicémique et toxémique se met en place avec détresse respiratoire, hypoxie, cyanose, hypothermie, état de choc, épanchement pulmonaire caractéristique et, en moins de 24 heures, mort du patient. Dans 50% des cas, une méningite charbonneuse se déclare, plongeant le patient dans le coma.

Les ovins peuvent mourir en quelques minutes avec pour seuls symptômes un déficit respiratoire et éventuellement un saignement au niveau des orifices corporels. Les autres espèces meurent 24 à 48 heures après l'apparition des symptômes cliniques (pour revue, (Shafazand *et al.*, 1999)).

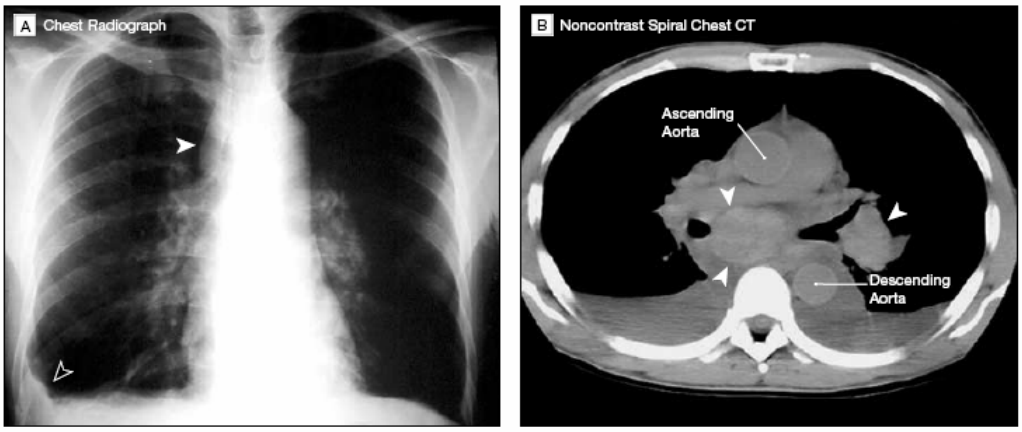


Figure 11 : Forme pulmonaire de la maladie du charbon. Cas après exposition bioterroriste, États-Unis, 2001. ***A***, radio thoracique, la flèche pleine indique l'élargissement du médiastinum, la flèche noire montre un épenchement pleural ; ***B***, tomodensitométrie sans injection de produit de contraste. Les flèches pleines indiquent des ganglions hypertrophiés, on remarque aussi les épanchements pleuraux bilatéraux (Mayer *et al.*, 2001)

3.4. Prophylaxie et thérapeutique

B. anthracis est sensible à de nombreux antibiotiques, la pénicilline fut longtemps l'antibiotique de choix pour le traitement de la maladie. Des souches résistantes ayant été décrites, les fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine ou lévofloxacine) ou une tétracycline (la doxycycline) sont maintenant recommandées. La mise en application des protocoles de traitement doit se faire le plus rapidement possible, même en l'absence de signes cliniques et doit concerner toute la population exposée.

L'AFSSAPS (agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) recommande une molécule de la famille des fluoroquinolones ou la doxycycline *per os* en prophylaxie de première intention chez l'adulte (ciprofloxacine : 1 g/jour en 2 prises). Seule la ciprofloxacine ou la doxycycline sont recommandées pour l'enfant de moins de 15 ans. En thérapeutique, les mêmes molécules sont recommandées par voie i.v.. La durée du traitement est de 8 semaines et un traitement relais est recommandé après isolement de la souche et évaluation de sa sensibilité en raison de la persistance potentielle des spores après une exposition par aérosol (AFSSAPS, 2005).

Les recommandations thérapeutiques du Service de Santé des Armées sont basées sur les mêmes molécules : l'administration de ciprofloxacine ou de doxycycline en choix de première intention, par voie orale en prophylaxie (500 mg toutes les 12 heures) ou par voie i.v. en thérapeutique (400 mg toutes les 12 heures). Après identification de la souche et étude

de sa sensibilité, un nouvel antibiotique plus adapté est administré avec un traitement d'une durée totale de 60 jours (SSA, 2004).

Le CDC (*Center for diseases control and prevention*) recommande l'administration de ciprofloxacine *per os* en prophylaxie. En thérapeutique, l'administration de ciprofloxacine ou de doxycycline associée à un ou deux autres agents antimicrobiens tels que la rifampicine, la vancomycine, la pénicilline ou l'ampicilline par voie i.v. est recommandée pour l'adulte. Pour l'enfant, le traitement est identique mais ramené à des doses appropriées. Le traitement doit être remplacé le plus rapidement possible par un traitement *per os* (ciprofloxacine ou doxycycline). La durée du traitement est de 60 jours (CDC, 2002).

Etant donnés les taux élevés de mortalité due à l'infection, le traitement des femmes enceintes ou des personnes immunodéprimées est généralement le même que pour l'adulte ou l'enfant, respectivement.

3.5. Vaccins

3.5.1. Les vaccins entiers

3.5.1.1. Le vaccin vivant atténué de Louis Pasteur

L'obtention d'une souche atténuée de *B. anthracis* a été essentielle pour le développement du premier vaccin vétérinaire efficace contre la maladie du charbon. Après l'expérience de Pouilly-le-Fort en 1881, un grand nombre de cheptels étaient vaccinés dans toute l'Europe et en Amérique du sud, diminuant considérablement l'impact de la maladie sur les animaux domestiques (Friedlander *et al.*, 2002). Ce vaccin vivant était atténué par la chaleur et était constitué à partir d'un bouillon de culture et contenait donc des formes végétatives de la bactérie. Ce vaccin fut utilisé jusqu'en 1935, date à laquelle une nouvelle souche et un nouveau conditionnement furent mis en place. Cependant, les vaccins atténués par la chaleur présentaient un problème de forte variation de virulence entre les différents lots (Hambleton et Turnbull, 1990). De plus, des travaux récents ont démontré une efficacité

moindre des vaccins à base de formes végétatives comparativement aux vaccins à base de spores (Cohen *et al.*, 2000 ; Aloni-Grinstein *et al.*, 2005).

3.5.1.2. **Le vaccin Sterne à base de spores d'une souche atténuée**

En 1937, Max Sterne développa une souche de *B. anthracis* atténuée, acapsulée et stable. L'utilisation de ces spores comme vaccin vétérinaire fut d'une grande efficacité et son innocuité en fait encore de nos jours le vaccin de choix pour les animaux domestiques. Une seule dose engendre une immunité efficace, des rappels annuels restant nécessaires (Hambleton *et al.*, 1984). Toutefois, ce type de vaccin présente une virulence résiduelle, écartant la possibilité de son utilisation chez l'homme dans les pays développés, exepté pour le vaccin russe (cf. § 3.5.1.3.) (Welkos et Friedlander, 1988).

3.5.1.3. **Le vaccin russe**

Le vaccin russe est un vaccin vivant à base de spores de souches atténuées, utilisé à la fois dans un cadre médical et vétérinaire (selon leurs propres normes de santé publique). En 1940, deux souches atténuées acapsulées furent isolées : la souche STI-1 et la souche n°3 (Shlyakhov et Rubinstein, 1994) apparentées à la souche Sterne. Après des essais concluant en laboratoire, la souche STI-1 a été utilisée pour la vaccination du bétail en très large proportion. Pour le vaccin humain, un mélange des deux souches est utilisé encore aujourd'hui avec deux modes d'administration, soit par scarification, soit par injection sous-cutanée. Un rappel annuel est nécessaire et les deux méthodes ont montré une bonne efficacité contre le charbon cutané, cependant aucune donnée concernant l'immunisation contre une infection par inhalation n'est disponible (Shlyakhov et Rubinstein, 1994).

3.5.2. Les vaccins acellulaires

Les vaccins acellulaires sont obtenus par purification d'Ag de surnageants de cultures de *B. anthracis*. Ils sont principalement basés sur l'obtention de la protéine PA. Les perfectionnements du milieu de culture utilisé, des procédures de fermentation, de la sélection des souches utilisées et des procédés de production, ont conduit au développement de vaccins efficaces dans les années 1950.

3.5.2.1. **Le vaccin anglais**

La vaccin anglais a été développé en 1950 et fut breveté en 1979 (Turnbull, 2000). Il est essentiellement constitué de la protéine PA et provient d'un surnageant de culture de la souche Sterne 34F2 filtré à 0,2 µm ; PA est ensuite précipité avec du phosphate d'aluminium. Cependant, des traces de EF et LF ainsi que d'autres protéines telles que EA1 et Sap (constituants de l'enveloppe bactérienne) sont présentes et induisent chez l'homme un fort taux d'anticorps (Ac) anti-EF ou LF comparativement au vaccin américain (Whiting *et al.*, 2004). L'inoculation se fait par voie intra-musculaire avec 3 doses à 0, 3 et 6 semaines, suivies d'une dose à 6 mois. Un rappel annuel est ensuite nécessaire. Des effets secondaires locaux (oedème, douleurs, érythème) et/ou systémiques (fièvre, malaises, syndrome pseudo-grippal) notables ont été relevés (Enstone *et al.*, 2003).

3.5.2.2. **Le vaccin américain**

Le vaccin protéique AVA (*Anthrax Vaccine Adsorbed*) fut produit pour la première fois dans les années 60 suite à une modification du protocole d'obtention de la protéine PA mis au point par Wright et Puziss en 1957 (Wright et Puziss, 1957). PA est obtenu à partir d'un surnageant de fermentation de la souche atténuée V770-NP1-R acapsulée, non-protéolytique et. Le filtrat est ensuite adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium. Le protocole de vaccination comprend une injection par voie sous-cutanée à 0, 15 et 30 jours, puis une

nouvelle injection à 6, 12 et 18 mois avec, par la suite, des rappels annuels. L'efficacité du vaccin a été testé sur plusieurs animaux de laboratoires (souris, cobaye, lapin, primate non-humain) et a montré des variations notables lors de l'épreuve d'infection par inhalation entre espèces et en fonction de la souche utilisée (Ivins *et al.*, 1998 ; Fellows *et al.*, 2001). Des effets secondaires sont parfois observés avec des effets locaux (rougeurs, induration, oedème, prurit, douleur) et des effets systémiques plus rares (fièvres, myalgies, malaises). Ces effets restent comparables aux effets secondaires d'autres vaccins (Pittman *et al.*, 2002).

3.5.3. Les vaccins en développement

Bien que les vaccins américain et anglais soient donnés pour être relativement efficaces, ils présentent cependant des effets secondaires notables et nécessitent un protocole d'administration extrêmement lourd (plusieurs injections et rappels annuels). Les efforts de recherches se dirigent donc vers l'obtention d'un vaccin efficace pour la protection contre la forme d'inhalation et dépourvu d'effets secondaires.

La majorité des vaccins en développement sont à base de protéine PA recombinante (rPA) (Flick-Smith *et al.*, 2002). Certains vaccins associent PA à des Ag de *B. anthracis* tels que des spores inactivées, qui agissent en synergie avec PA pour augmenter le pouvoir protecteur du vaccin (Brossier *et al.*, 2002) ; ou conjugué à du PGA qui optimise l'immunogénicité du vaccin (Rhie *et al.*, 2003 ; Chabot *et al.*, 2004 ; Joyce *et al.*, 2006).

3.6. L'immunothérapie passive

La thérapie anti-infectieuse par Ac, ou séro-thérapie, consiste en l'administration d'immunoglobuline ou de sérum pour prévenir ou traiter une infection. Les stratégies d'immunothérapie passive ont généralement pour objectif l'inhibition de l'activité des toxines.

Les Ac anti-PA peuvent neutraliser différentes étapes du mécanisme d'internalisation des toxines en ciblant les différents domaines de PA et donc en bloquant : (i) l'interaction PA-récepteurs ; (ii) le site de clivage de PA_{83} ; (iii) l'oligomérisation en heptamère $[PA_{63}]^7$; (iv)

ou encore la fixation des facteurs EF ou LF. Plusieurs travaux sur l'utilisation d'Ac anti-PA en immunisation passive ont montré l'intérêt de cette stratégie : avec des Ac monoclonaux murins anti-PA chez la souris intoxinée (Brossier *et al.*, 2004), avec des Ac monoclonaux murins anti-PA chez le rat intoxiné (Little *et al.*, 1988), avec des sérums polyclonaux anti-PA chez le cobaye infecté (Little *et al.*, 1997), enfin avec des Ac humains dérivés de donneurs immunisés par le vaccin américain AVA chez le rat (Wild *et al.*, 2003). En France, la vaccination chez l'homme n'étant pas pratiquée, l'accès à des donneurs de sang immunisés contre le charbon est difficile. L'utilisation d'Ac de macaque anti-PA pourrait être une alternative aux Ac humains (Laffly *et al.*, 2005).

Les Ac anti-LF, malgré le rôle majeur de LF lors de l'infection, n'ont pas encore montré de protection chez l'animal contre une infection par inhalation (Little *et al.*, 1990 ; Lim *et al.*, 2005).

Une autre stratégie de thérapeutique alternative, mais que nous ne développerons pas ici, est l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques des toxines. Ainsi, plusieurs inhibiteurs chimiques de LF et EF ont pu être générés (revus dans, (Burnett *et al.*, 2005)).

Chapitre II

« Organisation du système immunitaire des muqueuses respiratoires »

1. Organisation générale du système respiratoire

La fonction des poumons est de permettre l'apport d'oxygène et l'élimination de dioxyde de carbone. L'échange gazeux se produit dans les alvéoles par diffusion à travers l'épithélium fin et les capillaires sanguins situés à proximité de la paroi alvéolaire. Les poumons constituent une large surface épithéliale en contact direct avec l'environnement extérieur. Les voies aériennes supérieure et inférieure sont continuellement exposées à une multitude de microorganismes et de particules volatiles et un système élaboré de mécanismes de défense maintient l'homéostasie pulmonaire.

1.1. Les voies aériennes supérieures

Les voies aériennes supérieures comprennent différentes structures qui vont de la cavité nasale aux bronchioles (Figure 12*A*). Leur rôle est d'amener l'air inspiré jusqu'aux alvéoles pulmonaires où se produisent les échanges gazeux.

La cavité nasale et les sinus procurent une large surface pour chauffer et humidifier l'air inspiré. Les particules de grandes tailles présentes dans l'environnement sont capturées grâce à la sécrétion de mucus et aux cellules ciliées de l'épithélium de la cavité nasale qui créent un flux continu par les battements coordonnés de leurs cils.

Le nasopharynx contient un abondant tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT (*mucosal-associated lymphoid tissue*) qui échantillonne le matériel antigénique inhalé et prépare les mécanismes de défense adaptés.

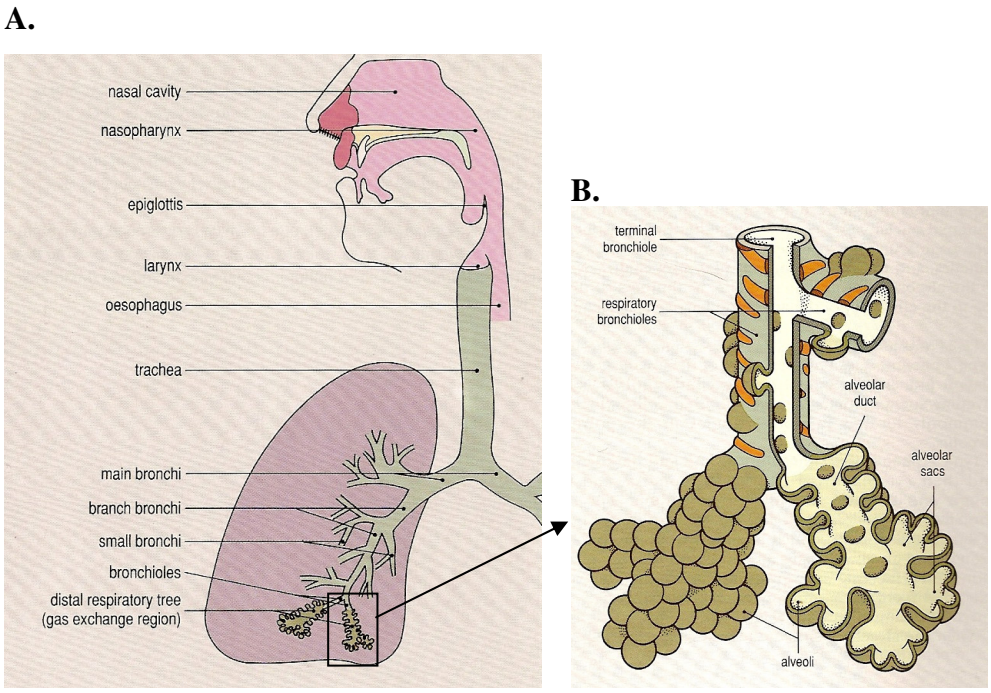


Figure 12 : Organisation générale du système pulmonaire. ***A***, Organisation des voies aériennes supérieures ; ***B***, Organisation des voies aériennes inférieures (d'après (Stevens et Lowe, 1992))

Le larynx possède une architecture complexe de façon à prévenir l'entrée d'air dans l'œsophage et l'entrée d'aliments et de liquides dans la trachée. C'est à ce niveau que sont situées les cordes vocales.

La trachée descend dans la cage thoracique où elle se divise en deux bronches souches. Elle est recouverte d'un épithélium cilié qui contient de nombreuses glandes séro-muqueuses. Les deux bronches souches extra-pulmonaires entrent dans chaque poumon avec les artères pulmonaires *via* le hile pulmonaire. Elles se divisent alors en bronches lobaires qui entrent dans chaque lobe pour se séparer ensuite en bronches segmentaires. La structure des bronches est similaire à celle de la trachée et comprend : un épithélium pseudostratifié cilié, un tissu subépithélial fibro-collagéneux avec de nombreuses glandes séro-muqueuses, des muscles lisses et des anneaux de cartilage. Le fluide séreux secrété par les glandes bronchiques est principalement constitué de lysozyme et de glycoprotéines. Des cellules immunitaires sont aussi présentes et sont associées aux glandes bronchiales, ce sont principalement des lymphocytes B et des plasmocytes IgA-secréteurs qui forment des agrégats aux bifurcations de l'arbre bronchial proximal.

1.2. Les voies aériennes inférieures

Les voies aériennes inférieures sont le lieu des échanges gazeux entre l'air inhalé et le sang. Elles sont constituées des bronchioles et des alvéoles pulmonaires regroupées en sacs alvéolaires (Figure 12*B*).

Les bronchioles se divisent en de nombreux conduits alvéolaires, réduisant peu à peu la taille de leur lumière alvéolaire (Figure 12*A*). Elles possèdent un épithélium cilié mais il n'est plus pseudostratifié et le cartilage est remplacé par les muscles lisses qui deviennent le composant majeur de la structure basale.

Les alvéoles sont des sacs d'air ouverts sur les conduits alvéolaires. Elles sont le site des échanges gazeux. Chaque alvéole est un espace d'air polygonal avec une paroi très fine en contact avec les capillaires pulmonaires (Figure 13*A*). Des communications entre alvéoles voisines sont observées, ce sont les pores de Kohn.

2. Organisation histologique et fonctionnelle du système immunitaire des voies aériennes inférieures

2.1. Les cellules épithéliales pulmonaires

2.1.1. Les cellules épithéliales bronchiques

Les cellules épithéliales sont des cellules orientées avec une face apicale pouvant être ciliée et une face basale. Chez l'homme, plusieurs types de cellules épithéliales sont décrits au niveau de l'épithélium pulmonaire. Ces cellules se différencient par leur morphologie mais aussi par leurs propriétés fonctionnelles et biochimiques. Elles peuvent ainsi être classées en trois catégories : les cellules basales, les cellules ciliées (cellules épithéliales bronchiques ou

CEB) et les cellules sécrétoires (cellules caliciformes, cellules séreuses et cellules de Clara) (Jeffery, 1983).

Les cellules basales sont ubiquitaires et représentent les progéniteurs des cellules épithéliales ciliées et des cellules caliciformes au niveau de la trachée. Elles adhèrent fermement à la lame basale et peuvent secréter des molécules actives telles que des cytokines ou de l'endopeptidase (Stevens et Lowe, 1992).

Les CEB ciliées correspondent au stade de différenciation terminale des cellules épithéliales (Figure 13*B*). Elles sont présentes sur tout l'épithélium bronchique et permettent la clairance muco-ciliaire grâce aux battements coordonnés de leurs cils (Stevens et Lowe, 1992).

Les cellules caliciformes, ou à mucus, sont présentes au niveau des bronches et des bronchioles mais absentes des alvéoles. Leur cytoplasme apical est chargé de granules clairs contenant des mucines. Les cellules caliciformes peuvent, en certaines occasions, se différencier en CEB ciliées. Les cellules séreuses possèdent de nombreuses vésicules denses dont la composition et le rôle ne sont pas encore connus.

Chez l'homme, les cellules de Clara sont des cellules épithéliales abondantes au niveau de l'épithélium des bronchioles. Elles sécrètent le surfactant pulmonaire ainsi que des oxydases. Elles constituent les progéniteurs des cellules bronchiques (Bishop, 2004).

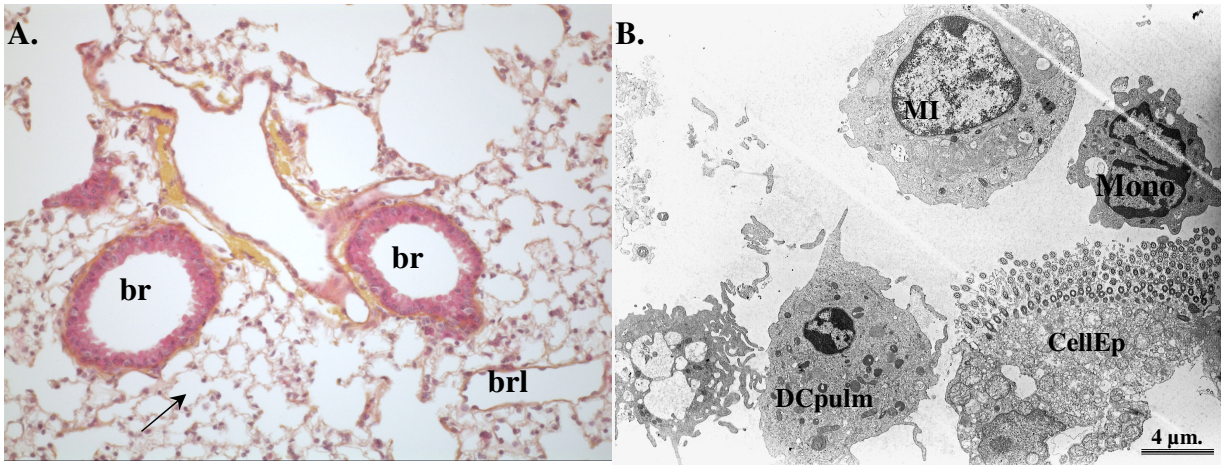


Figure 13 : ***A*****,** histologie du poumon chez la souris (coloration à l'hématoxyline-éosine-safran, Cleret A., Bernabé D., Service d'imagerie, CRSSA) : br. bronche ; brl. bronchiole ; la flèche désigne une alvéole ; ***B***, observation en MET des différents types cellulaires pulmonaires chez la souris après digestion enzymatique du tissu pulmonaire (Cleret A., Vachez-Collomb L., Service d'imagerie, CRSSA). CellEp : cellule épithéliale ciliée ; MI : macrophage interstitiel ; Mono : Monocyte ; DCpulm : cellules dendritique pulmonaire potentielle (basé sur (von Garnier *et al.*, 2005)).

Le surfactant pulmonaire est un composant essentiel du mucus. Il est principalement composé de phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidylglycérol) et de quatre protéines associées : *surfactant protein* (SP)-A, -B, -C et -D. Les protéines SP-A et SP-D sont des protéines de la famille des lectines calcium-dépendantes (collectines) et jouent un rôle primordial dans l'immunité innée. Chacune d'elle est capable de se fixer à une grande variété de micro-organismes (Shepherd, 2002). Il a été montré que SP-D augmente la phagocytose des micro-organismes par les macrophages (Takahashi *et al.*, 2006), mais aussi par les cellules dendritiques immatures, facilitant leur activation et la présentation d'Ag aux cellules T (Brinker *et al.*, 2001). Les protéines SP-B et -C jouent un rôle dans la structure physique du surfactant.

2.1.2. Les cellules épithéliales alvéolaires

Les pneumocytes de type 1, ou cellules alvéolaires de type 1, représentent près de 40% de la population cellulaire alvéolaire et 90% d'entre eux composent la paroi des sacs alvéolaires et des alvéoles (Stevens et Lowe, 1992). Les cellules sont liées entre-elles par des jonctions serrées. Ce sont des cellules allongées avec un noyau aplati et contiennent peu de mitochondries ou d'organelles. Leur cytoplasme constitue une fine couche sur la membrane basale alvéolaire, contribuant ainsi à l'efficacité de la barrière alvéolo-capillaire. Les pneumocytes de type 1 ont une haute perméabilité osmotique *via* l'expression d'aquaporine 5 à leur surface apicale (Dobbs *et al.*, 1998). Ces cellules sont très difficiles à isoler en culture cellulaire car très fragiles.

Les pneumocytes de type 2, ou cellules alvéolaires de type 2, représentent 60% de la population cellulaire des alvéoles mais couvrent seulement 5 à 10% de la surface alvéolaire. Ce sont des cellules rondes situées aux angles obtus des polygones alvéolaires (Stevens et Lowe, 1992). Leur cytoplasme est riche en mitochondries et en réticulum endoplasmique lisse et rugueux. Il contient aussi des vésicules denses aux électrons et de larges corps sphériques riches en phospholipides, en protéines et en glycosaminoglycanes qui forment la base du surfactant pulmonaire. Ce sont les progéniteurs cellulaires de l'épithélium alvéolaire car ils peuvent se différencier en pneumocytes de type 1 et sont ainsi à l'origine de la régénération de l'épithélium après une lésion. Les pneumocytes de type 2 jouent aussi un rôle dans le transport de sodium et de fluides de la lumière alvéolaire vers l'interstitium par une différence

de potentiel de membrane du côté apical et la présence de nombreux canaux sodiques et des pompes Na/K ATPase du côté basolatéral de la cellule (Mason *et al.*, 1982). L'abondance des mitochondries permet de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des pompes. Les pneumocytes de type 2 jouent ainsi un rôle important dans l'élimination des œdèmes alvéolaires (Mason *et al.*, 1982). Ils ont un taux de renouvellement lent, de l'ordre de 2 à 3 semaines.

2.2. Les macrophages pulmonaires

Les macrophages sont présents dans de nombreux tissus où ils jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie, dans la défense de l'hôte et dans la reconstitution tissulaire. Dans le poumon, les macrophages sont présents dans les espaces alvéolaires (MA, macrophages alvéolaires) mais aussi dans l'interstitium pulmonaire (MI, macrophages interstitiels). Les macrophages pulmonaires (MΦpulm) phagocytent les particules fines (charbon, poussière) et les pathogènes qui atteignent l'espace alvéolaire ou le septum inter-alvéolaire (interstitium).

2.2.1. Origine et caractérisation des macrophages pulmonaires

2.2.1.1. Origine

Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) issues de la différenciation de monocytes originaires de la moelle osseuse. Les monocytes proviennent de progéniteurs myéloïdes communs qui, après différenciation, quittent la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine et renouveler les populations de macrophages tissulaires (Figure 14) (pour revue, (Gordon et Taylor, 2005)).

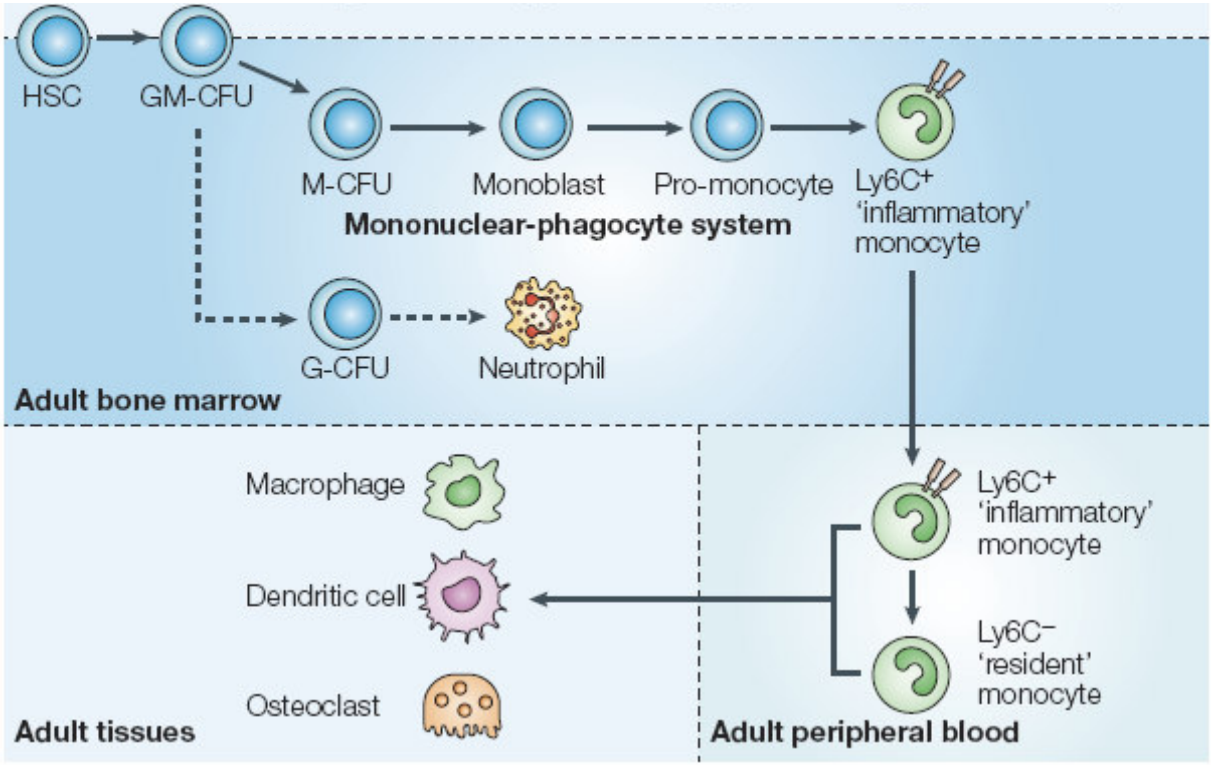


Figure 14 : Origine et différenciation hématopoïétique des cellules présentatrices d'antigènes (d'après (Gordon et Taylor, 2005)). HSC : cellule souche hématopoïétique ; G/M/GM-CFU : granulocyte/macrophage/granulocyte -macrophage *colony-forming unit.*

Les MΦpulm proviendraient à la fois de progéniteurs sanguins et de la prolifération locale des monocytes. Des premiers travaux portant sur la déplétion transitoire des précurseurs monocytaires de la moelle osseuse chez la souris ont abouti à la déplétion des monocytes sanguins sans affecter le nombre de MA et sont donc en faveur de la prolifération locale ; toutefois, ces expérimentations ont seulement permis une étude à court terme (10-15 jours) (Sawyer *et al.*, 1982). D'autres études favorisent la théorie de la prolifération locale de précurseurs comme source principale des MΦpulm en condition d'homéostasie. Ainsi, l'étude de chimères irradiées chez la souris montre que, lorsque les poumons sont protégés des radiations, les MA proviennent de la souris hôte jusqu'à un an après traitement (Tarling *et al.*, 1987). Cependant, une autre étude montre qu'après irradiation totale et greffe de moelle osseuse chez la souris, les MA sont remplacés par des cellules du donneur pendant une période prolongée, indiquant que les MA peuvent être renouvelés par des précurseurs de la moelle osseuse (Matute-Bello *et al.*, 2004).

Les études chez l'homme, sur des patients ayant reçu une greffe allogénique de moelle osseuse, montrent que le renouvellement des MA est dû au recrutement de précurseurs suivi de la prolifération des cellules *in situ* (Thomas *et al.*, 1976 ; Nakata *et al.*, 1999).

Le GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) joue un rôle crucial dans la physiologie pulmonaire et dans le maintien de la population des MΦpulm puisque la maturation et l'activation des MA de souris déficientes en GM-CSF sont inhibées (Stanley *et al.*, 1994 ; Hamilton, 2002).

Un travail récent suggère qu'une sous-population spécifique de monocytes $Gr1^{faible}/CX_3CR1^{fort}$ donne naissance, chez la souris, à la population de MΦpulm au sein du tissu pulmonaire (Landsman *et al.*, 2007).

Les MI, présents dans l'interstitium pulmonaire, représentent seulement 3% de la population cellulaire totale (von Garnier *et al.*, 2005). C'est pourquoi de nombreuses études sur les MΦpulm utilisent la méthode des lavages broncho-alvéolaires (LBA) afin d'obtenir un nombre suffisant de MA sans effectuer de traitement enzymatique ni de tri cellulaire (Figure 15). En effet, les LBA sont composés en moyenne de plus de 80% de MA (Vermaelen et Pauwels, 2004 ; von Garnier *et al.*, 2005).

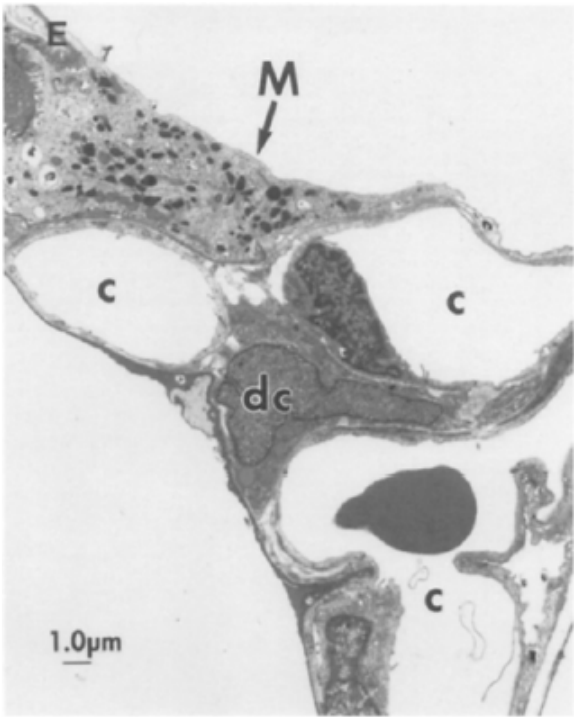


Figure 15 : Caractérisation du tissu alvéolaire chez le rat par MET. M, macrophage alvéolaire ; E, épithélium (pneumocyte de type 1) ; dc, cellule dendritique ; c, lumière des capillaires (d'après (Holt *et al.*, 1993)).

2.2.1.2. Caractérisation chez la souris

Les MA mesurent de 8 à 10 µm et leur ultrastructure est caractérisée par la présence de nombreuses vacuoles cytosoliques transparentes aux électrons (Figure 16*A*) (von Garnier *et al.*, 2005). L'ultrastructure des MI est similaire (Figure 16*B*) (von Garnier *et al.*, 2005). Les deux populations de macrophages pulmonaires partagent aussi un phénotype proche à la fois pour les marqueurs de lignée cellulaire (CD11c, CD11b, CD54, CD103, Gr1), de maturation (F4/80) et de co-stimulation (CMH II, CD2, CD40, CD80, CD86) (Tableau III) (Vermaelen et Pauwels, 2004 ; von Garnier *et al.*, 2005). Les MΦpulm murins expriment fortement le marqueur membranaire CD11c et présentent une forte autofluorescence (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 2003 ; Vermaelen et Pauwels, 2004 ; von Garnier *et al.*, 2005).

Les MA et MI sont donc des cellules très proches au niveau phénotypique. Toutefois une étude a montré qu'elles présentaient des différences au niveau de la capacité de phagocytose et de l'activité bactéricide, plus importantes pour les MA, tandis que les MI ont une plus forte capacité à sécréter des cytokines immunorégulatrices (Franke-Ullmann *et al.*, 1996).

A. **B.**

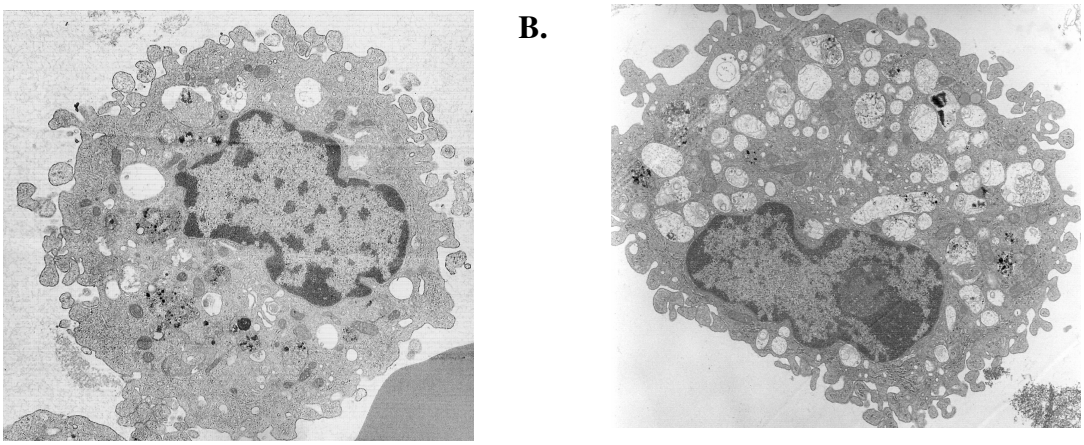


Figure 16 : Macrophages pulmonaires murins observés en MET (Cleret A., Vachez-Collomb L., Service d'imagerie, CRSSA) : ***A,*** macrophage alvéolaire ; ***B,*** macrophage interstitiel.

2.2.1.3. Caractérisation chez l'homme

Les analyses chez l'homme portent essentiellement sur les MA obtenus par des LBA lors de suivis cliniques de patients. Contrairement à la souris, les MA humains expriment un profil $CD11b^+$ et $CD11c^-$ (Tableau III) (Weyde *et al.*, 1997 ; Tailleux *et al.*, 2005). Par contre, ils présentent eux aussi une forte autofluorescence (Weyde *et al.*, 1997) et se différencient des cellules dendritiques pulmonaires par l'absence d'expression du marqueur membranaire DC-SIGN (*DC-specific ICAM-grabing non-integrin*) (Tailleux *et al.*, 2005).

Tableau III : Expression des principaux marqueurs de surface par les MA et les MI chez la souris (***A***) et par les MA chez l'homme (***B***).

A.	Marqueurs de surface										
Type cellulaire	CD11c	CD11b	CMH II	CD2	CD54	CD40	CD80	CD86	CD103	F4/80	Gr1
MA (LBA)	+++	-	+/-	+++	+++	-	++	-	-	+++	++
MI (Poumons)	+++	-	+/-	+++	+++	-	+++	+/-	-	+++	++

B.	Marqueurs de surface			
Type cellulaire	CD11c	CD11b	CMH II	DC-SIGN
MA (LBA)	-	+++	+/-	-

2.2.2. Fonctions

La stérilité des poumons réside en partie dans les capacités phagocytaires et lytiques des MΦpulm. Les MΦpulm participent à l'élimination des particules fines et des débris de la portion non-ciliée des poumons.

2.2.2.1. Phagocytose et élimination des éléments alvéolaires

Les MΦpulm sont des phagocytes très performants. Ils expriment un large panel de PRR leur permettant de détecter rapidement la présence de pathogènes. L'engagement des

PRR active différentes voies de signalisation intracellulaire conduisant à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β (Gordon et Read, 2002 ; Rosenberger et Finlay, 2003). Les MΦpulm expriment aussi les récepteurs au fragment Fc des IgG (RFc) et au complément (CR3, opsonines) qui augmentent leurs capacités de phagocytose (Delclaux et Azoulay, 2003). Ils participent ainsi à l'homéostasie pulmonaire par phagocytose d'éléments pathogènes ayant pénétré jusqu'aux alvéoles et jouent un rôle central dans de nombreuses pathologies infectieuses telle que la tuberculose (Russell, 2001).

Une fonction essentielle des MΦpulm est aussi l'élimination des corps cellulaires apoptotiques et des cellules en cours de programme de mort cellulaire. Les cellules apoptotiques exposent sur la face externe de leur membrane plasmique un certain nombre de molécules (calréticuline, phosphatidylsérine, sucres aminés) absentes sur les cellules vivantes. Ces molécules sont reconnues par les intégrines, les collectines, les récepteurs *scavenger*, ou le récepteur à la phosphatidylsérine exprimés par les macrophages (Henson *et al.*, 2001 ; Albert, 2004).

Une étude a montré que des souris déplétées en MA développent une inflammation pulmonaire suite à une infection à pneumocoque (Knapp *et al.*, 2003). Cette inflammation est caractérisée par un fort recrutement de PNN suivi de leur apoptose. En l'absence d'élimination des corps apoptotiques par les macrophages une nécrose tissulaire est rapidement observée (Knapp *et al.*, 2003). Les MΦpulm ont donc un rôle protecteur anti-inflammatoire lors d'une infection bactérienne. Suite à la phagocytose des corps apoptotiques, les MΦpulm secrètent des médiateurs immuno-suppresseurs qui garantissent le maintien de l'état d'homéostasie et empêchent le développement d'une réaction inflammatoire (Matute-Bello et Martin, 2003 ; Tournier et Quesnel-Hellmann, 2006). Des dysfonctionnements dans ce processus sont observés chez les personnes asthmatiques (Peters-Golden, 2004).

2.2.2.2. Contrôle de l'homéostasie pulmonaire

En absence d'inflammation, les MΦpulm sont des cellules quiescentes, produisant peu de cytokines pro-inflammatoires (Holt, 1978). Ils produisent cependant divers médiateurs tels que l'oxide nitrique (NO), l'IL-1 récepteur antagoniste (IL-1ra) et le *transforming growth factor* (TGF)-β (Nicod *et al.*, 1994) qui suppriment directement l'activation des cellules T

(Bingisser *et al.*, 1998 ; Bingisser et Holt, 2001) ainsi que la maturation et les fonctions CPA des cellules dendritiques (Thepen *et al.*, 1989 ; Holt *et al.*, 1993 ; Paolucci *et al.*, 2000). La réponse immune spécifique est ainsi directement inhibée au sein des poumons.

Une étude récente a montré que le TGF-β interagit avec l'intégrine αvβ6 exprimée à la surface des cellules épithéliales alvéolaires (Morris *et al.*, 2003) et inhibe les fonctions des MA (Figure 17, 1) (Takabayshi *et al.*, 2006). Les MA restent toutefois capables de reconnaître les micro-organismes inhalés *via* les TLR (Lambrecht, 2006b) provoquant dans ce cas une diminution de l'expression de l'intégrine αvβ6 par les cellules épithéliales. L'inhibition des MA est ainsi levée (Figure 17, 2). Les MA retrouvent alors leur capacité de phagocytose et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules T activées, recrutées sur le site de l'inflammation, induisent la production de MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*) par les MA *via* la sécrétion d'interféron (IFN) -γ (Figure 17, 3). Les MMP-9 sécrétées clivent le TGF-β inactif présent et induisent l'expression de l'intégrine αvβ6 par les cellules épithéliales. Le complexe TGF-β-αvβ6 inhibe à nouveau les fonctions des MA et l'homéostasie alvéolaire est retrouvée (Takabayshi *et al.*, 2006).

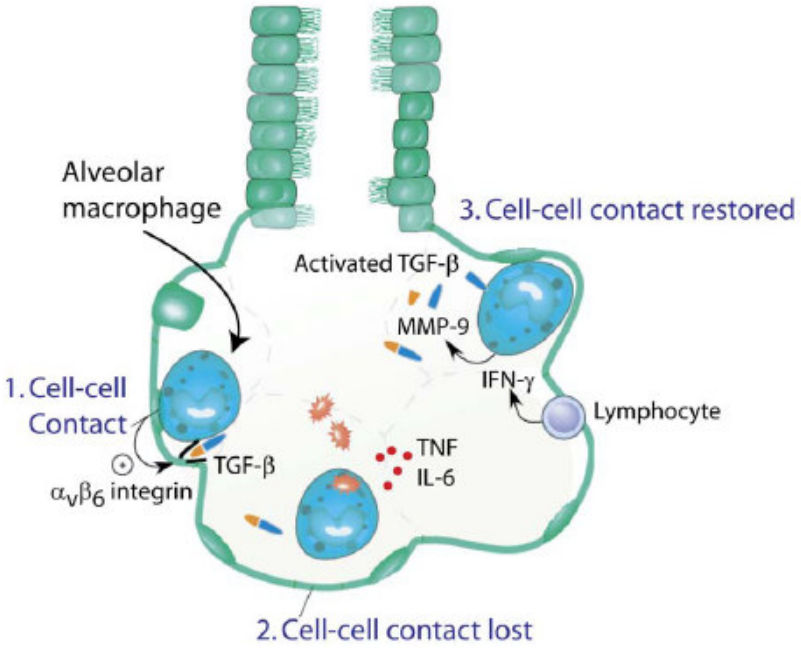


Figure 17 : Inhibition/activation des MA et contrôle de l'immunité pulmonaire (d'après (Lambrecht, 2006b)).

2.2.2.3. Recrutement cellulaire

La stimulation directe des MΦpulm par des produits bactériens ou indirecte *via* la réponse à un stress, induit l'activation de la NADPH oxydase qui stimule la production de superoxydes et de H_2O_2 par les MΦpulm (Iles et Forman, 2002). Le H_2O_2 joue le rôle de second messager chez les MΦpulm et active les facteurs de transcription de la famille NF-$_\kappa$B, induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et le TNF-α (Franke-Ullmann *et al.*, 1996 ; Iles et Forman, 2002). Le TNF-α augmente l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et les monocytes. Il augmente aussi la perméabilité des barrières endothéliales et épithéliales, ce qui permet le recrutement de PNN. En fait, le TNF-α et l'IL-1β sécrétés par les MΦpulm ont une faible activité chimioattractante, mais ce sont des inducteurs potentiels de la production de CXCL8 (ou IL-8) par les MΦpulm, les pneumocytes de type 2 et les fibroblastes pulmonaires. CXCL8 est le facteur chimiotactique majeur des PNN dans les poumons (pour revue, (Kelley, 1990)).

Il a aussi été montré que l'activation des MA humains *via* les RFc ou les récepteurs au complément induit la production de CXCL8, de CCL2 (ou *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1), et de facteurs de croissance tels que le M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*) (Standiford *et al.*, 1991). CCL2 est une chimiokine jouant un rôle majeur dans le recrutement des monocytes CCR (*CC-chemokine receptor*) 2^+ dans les poumons (Rosseau *et al.*, 2000). De plus, la production de CCL2 par les cellules épithéliales peut être augmentée par le TNF-α et l'IL-1β sécrétés par les MA dans les phases précoces d'une infection (Standiford *et al.*, 1991).

Les MΦpulm sont aussi capables d'activer la réponse immune adaptative *via* la production de cytokines et par leur fonction CPA (Rosenberger et Finlay, 2003). Ils activent ainsi les cellules T $CD8^+$ ou les cellules T $CD4^+$ qui interagissent avec les cellules B productrices d'Ac. Cependant les MΦpulm n'ont pas la capacité de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques ou d'activer les cellules T naïves contrairement aux cellules dendritiques (cf. § 2.3.1.).

Les MΦpulm sont donc des cellules immunitaires essentielles du poumon. Leur rôle consiste à la fois à éliminer les particules fines, les pathogènes et les corps apoptotiques de l'espace alvéolaire, mais aussi au maintien de l'homéostasie pulmonaire en inhibant l'activation des cellules du système immunitaire présentes. Lors d'une infection, ils sécrètent des facteurs chimioattractants permettant le recrutement des cellules du système immunitaire inné.

2.3. Les cellules dendritiques

2.3.1. Origines et fonctions générales

Les premières cellules dendritiques (DC) ont été identifiées et décrites en 1868 par Paul Langerhans dans les couches basales de l'épiderme (Langerhans, 1868). Les cellules de Langerhans (LC) ont une morphologie très particulière qui les amena dans un premier temps à être confondues avec des neurones. Ce n'est qu'en 1973 que l'origine leucocytaire des DC a été déterminée et que d'autres cellules de ce type ont été décrites dans plusieurs tissus tels que les organes lymphoïdes (Steinman et Cohn, 1973), le sang (Van Voorhis *et al.*, 1982), ou encore les muqueuses (Sertl *et al.*, 1986 ; Pavli *et al.*, 1996).

Les DC composent un groupe cellulaire hétérogène par leur localisation, leur état de maturation et leurs fonctions. Ce sont des leucocytes issus de cellules souches hématopoïétiques myéloïdes ou lymphoïdes présentes dans la moelle osseuse (Liu, 2001). Les précurseurs hématopoïétiques se différencient dans la moelle puis passent dans la circulation sanguine pour atteindre les tissus périphériques (Figure 14).

Les DC sont des CPA professionnelles. Elles sont les sentinelles du système immunitaire par leur localisation stratégique dans les tissus fortement exposés aux Ag (peau, muqueuses, rate).

Les DC présentent un continuum d'états durant leur maturation conduisant à la capacité de stimulation des lymphocytes T naïfs (pour revue, (Reis e Sousa, 2006)). Dans les tissus périphériques non lymphoïdes, les DC sont à l'état « immature » : elles ont une forte

capacité à reconnaître, à échantillonner et à apprêter l'Ag, mais une faible aptitude à stimuler les cellules T (Figure 18).

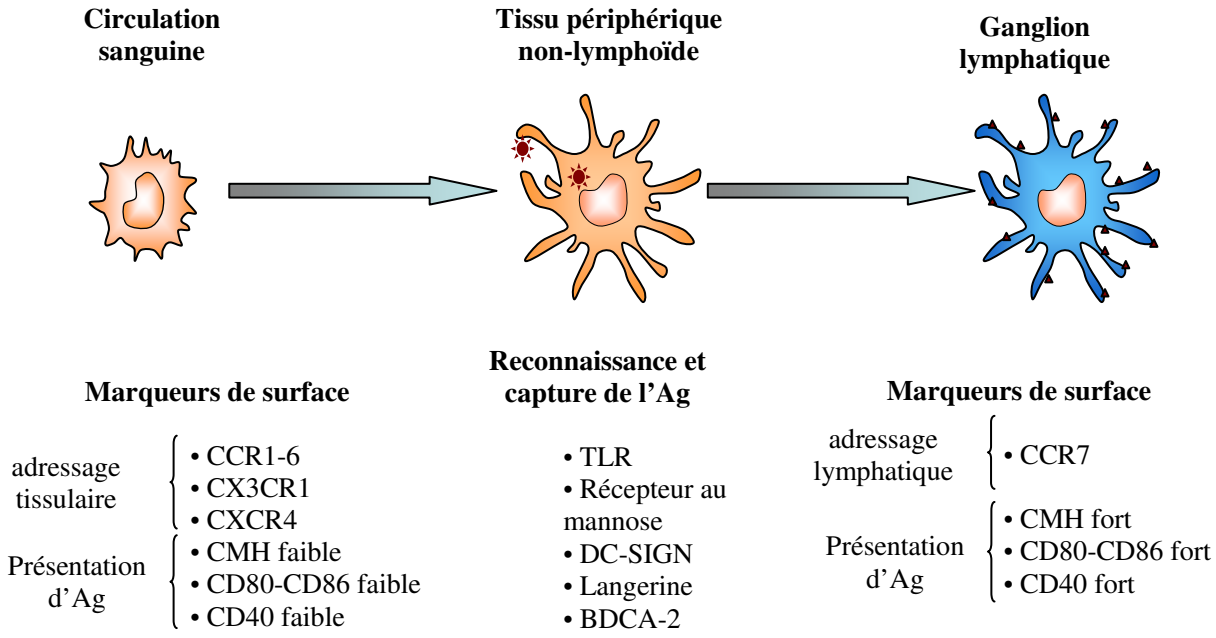


Figure 18 : Le rôle de sentinelle des DC et les différentes étapes de recrutement, phagocytose, activation/maturation et migration des DC (adapté d'après (Vermaelen et Pauwels, 2005)).

Lorsque la capture d'Ag est associée à des signaux de danger (DAMP (*danger-associated molecular pattern*) ou destruction tissulaire) (pour revue (Gallucci et Matzinger, 2001 ; Seong et Matzinger, 2004 ; Tournier et Quesnel-Hellmann, 2006)) ou à des PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) reconnus par les PRR exprimés à la surface des DC (pour revue, (Germain, 2004 ; Iwasaki et Medzhitov, 2004 ; Sansonetti, 2006)) (cf. § 2.3.3.), les DC subissent une série de changements phénotypiques et fonctionnels appelés activation/maturation.

Les fonctions de capture de l'Ag et d'apprêtement sont diminuées, une perte de l'expression des récepteurs aux chimiokines tissulaires CCR1 et CCR5 est observée et se trouve associée à une augmentation de l'expression du récepteur CCR7 (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006). Ce récepteur possède deux ligands, CCL19 et CCL21, fortement exprimés par les cellules stromales des zones riches en cellules T dans les ganglions lymphatiques (Randolph *et al.*, 2005 ; Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006). Un gradient de concentration de ces deux chimiokines est établi le long des vaisseaux lymphatiques (Randolph *et al.*, 2005). CCL21 est exprimé sous deux formes : CCL21-Leu, exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux

lymphatiques afférents initiaux (au niveau des organes périphériques) et CCL21-Ser, exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques afférents terminaux (au niveau des ganglions lymphatiques). CCL19 est exprimé par les cellules HEV (*high endothelial veins*) au niveau des ganglions lymphatiques (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006). Les gradients de concentrations ainsi formés permettent la migration des DC depuis les tissus jusqu'aux ganglions lymphatiques.

Au cours de leur migration, les DC augmentent la densité de molécules CMH-peptides associés à leur surface ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86 ou CD40 et la sécrétion de cytokines et chimiokines solubles. L'interaction des DC avec les cellules T naïves polarise ces dernières en cellules T *helper* (Th) effectrices et induit la prolifération des cellules Th Ag-spécifiques (cf. § 2.3.5.4.).

2.3.2. Localisation et caractérisation générale

2.3.2.1. Caractérisation chez la souris

Plus de six populations de DC conventionnelles (cDC) sont trouvées constitutivement chez la souris dont cinq dans les tissus lymphoïdes (Henri *et al.*, 2001) et une au niveau de la peau (pour revue, (Ardavin, 2003)).

La rate contient trois de ces populations : les DC double-négatives $CD4^-$ $CD8\alpha^-$ $CD11b^+$, les DC $CD4^+$ $CD8\alpha^-$ $CD11b^+$ et les DC $CD4^-$ $CD8\alpha^+$ $CD11b^-$ $DEC205^+$ (Tableau IV) (Henri *et al.*, 2001 ; Dakic et Wu, 2003). Les DC $CD8\alpha^+$ sont localisées au niveau des zones T, tandis que les DC $CD8\alpha^-$ se situent dans la zone marginale splénique. Les ganglions lymphatiques contiennent, outre les populations précédentes, deux populations supplémentaires : les DC $CD8\alpha^-$ $DEC205^+$ $CD11b^+$ et les DC $CD8\alpha^{faible}$ $DEC205^{faible}$ qui expriment la Langerine et sont la forme mature des LC de la peau ayant migré dans les ganglions lymphatiques (Tableau IV) (Anjuere *et al.*, 1999). Les LC constituent une autre sous-population de DC conventionnelles présente dans les couches basales de l'épiderme et dans les épithéliums stratifiés. Elles se caractérisent par une forte expression de la Langerine et de DEC205 tandis qu'elles expriment faiblement le CD8α (Anjuere *et al.*, 1999).

En plus de ces DC conventionnelles, une dernière sous-population de DC a été décrite et représente la sous-population de DC plasmacytoïdes (PDC) (Asselin-Paturel *et al.*, 2001 ; Nakano *et al.*, 2001). Les PDC murines sont CD11c$^+$ CMHII$^+$ CD45R/B220$^+$ Gr1$^+$ et 120G8$^+$ (Tableau IV) (Asselin-Paturel *et al.*, 2003). Elles sont présentes dans tous les ganglions lymphatiques et dans la moelle osseuse. Elles constituent la source principale d'IFN-α et d'IFN-β dans le cadre d'une infection virale. Les PDC activées expriment fortement le marqueur CD8α (Asselin-Paturel *et al.*, 2003 ; Colonna *et al.*, 2004).

Bien qu'à l'origine on pensait que la plupart des sous-populations de DC murines dérivaient de progéniteurs soit myéloïdes soit lymphoïdes, plusieurs travaux suggèrent que chacun des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes peuvent être à l'origine de chacune des sous-populations de DC (Traver *et al.*, 2000 ; Manz *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2001) (pour revue, (Wu et Dakic, 2004)).

Tableau IV : Phénotype des différentes sous-populations de DC dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse chez la souris.

	Sous-populations de DC					
	CD4$^-$CD8$^-$	CD4$^+$CD8$^-$	CD4$^-$CD8$^+$	CD8$^-$ DEC205$^+$	CD8^{faible} DEC205^{faible}	PDC
Phénotype						
CD11c	+	+	+	+	+	+
CD11b	+	+	-	+	-	-
CD80	+	+	+	+	+	ND
CD86	+	+	+	+	+	ND
CMH II	+	+	+	+	+	+
DEC205	-	-	+	+	faible	ND
F4/80	-	+	-	ND	ND	ND
Autres					Langerine (CD207)	Gr1 (Ly6G/C) CD45R/B220 120G8 CD8α
Fonction						
Phagocytose	oui	oui	oui	ND	ND	oui
Induction cellules T effectrices	oui	oui	oui	ND	ND	faible
Localisation	rate ganglions lymphatiques	rate ganglions lymphatiques	rate ganglions lymphatiques	ganglions lymphatiques	ganglions lymphatiques	moelle osseuse ganglions lymphatiques

ND : non disponible

2.3.2.2. Caractérisation chez l'homme

La majorité des connaissances sur les DC humaines ne proviennent pas de la purification directe des DC de tissus ou du sang, mais de leur développement *in vitro* à partir de précurseurs. Ainsi, un même progéniteur hématopoïétique $CD34^+$ peut engendrer quatre types de DC *ex vivo* : les cDC, comprenant les DC dérivées des monocytes (moDC), les DC interstitielles (iDC) et les LC ; et les PDC (Tableau V) (pour revue, (Rossi et Young, 2005)).

Les moDC sont des cellules circulantes qui peuvent être générées *in vitro* après différenciation de monocytes sanguins $CD14^+$ en présence de GM-CSF et d'IL-4, donnant naissance aux moDC $CD14^-$ $CD11c^+$ HLA-DR^{faible} E-cadhérine$^-$ langerine$^-$ (Sallusto et Lanzavecchia, 1994).

Les iDC sont présentes dans les tissus subépithéliaux du derme de la peau et des interstitiums des organes périphériques. Les iDC se développent à partir de progéniteurs $CD34^+$ *via* un intermédiaire $CD14^+$ (Caux *et al.*, 1997) et en présence de GM-CSF, de TNF-α et d'IL-4 (Jansen *et al.*, 1989). Les iDC ainsi générées ont un phénotype très proche des moDC et ne se différencient de ces cellules que par l'absence d'expression du CD52 (Ratzinger *et al.*, 2003).

Les LC sont présentes dans les épithéliums de la peau et des muqueuses. Ce type de DC peut être obtenu *ex vivo* à partir de progéniteurs $CD34^+$ en présence de GM-CSF et de TNF-α et en absence d'IL-4 (Caux *et al.*, 1992). Le TGF-β peut aussi jouer un rôle dans la différenciation en LC en absence de sérum (Strobl *et al.*, 1996). Les LC sont caractérisées par la présence de granules de Birbeck et par l'expression de Langerine et de la E-cadhérine (Valladeau *et al.*, 2000).

Les PDC humaines ont été découvertes bien avant leurs homologues murines et sont caractérisées par leur phénotype unique $CD123^+$ BDCA (*blood derived DC antibody*) -2^+ BDCA-4^+ $CD4^+$ L-selectine$^+$ $CD11c^-$ (Rissoan *et al.*, 1999). Le Flt3-L (*fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) est la principale cytokine permettant le développement des PDC à partir de progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ *in vitro* (Maraskovsky *et al.*, 2000) tandis que l'IL-3 joue un rôle majeur dans leur survie (Siegal *et al.*, 1999).

Tableau V : Phénotype des différentes sous-populations de DC chez l'homme.

	Niveau d'expression			
	cDC			PDC
	moDC	iDC	LC	
Marqueurs membranaires				
CD4	ND	ND	ND	+
CD11c	+	+	+	-
CD14	-	-	-	-
CD45RA	ND	ND	ND	+
CD52	+	-	-	+/-
CD83	+	+	+	+/-
CD123	+	+	+	++
HLA-DR	+/-	+/-	+	+
BDCA-2	-	ND	ND	+
BDCA-4	+/-	ND	ND	+
E-cadhérine	-	-	+	-
Langerine (CD207)	-	-	+	-

cDC : DC conventionnelles
moDC : DC dérivées de monocytes
iDC : DC interstitielles
LC : cellules de langerhans
PDC : DC plasmacytoïdes
ND : non disponible

2.3.3. Cellules dendritiques et PRR

La multiplicité de l'expression des PRR par les DC est une de leur caractéristique majeure : lectines de type C (par exemple, DC-SIGN, DEC205 (CD205), Langérine, récepteur au mannose (CD206), dectin-1 et -2 (pour revue (Robinson *et al.*, 2006)), molécules de la famille TREM (revue dans (Klesney-Tait *et al.*, 2006)) et TLR (Akira et Takeda, 2004 ; Iwasaki et Medzhitov, 2004). Par ailleurs, d'autres molécules intracytosoliques de la famille des NLR (*nucleotid-binding oligomerization domain* (NOD)-*like receptor*) (NOD-LRR, NACHT-LRR et CATERPILLAR) sont capables de jouer le rôle de PRR pour des PAMP et des DAMP (revue dans (Fritz *et al.*, 2006)), ainsi que des molécules de la famille des hélicases de type RIG (*retinoic acid-inducible gene 1*)-like, capables de reconnaître des motifs d'acides nucléiques viraux (revue par (Meylan *et al.*, 2006)). A la complexité des récepteurs,

s'ajoute la multiplicité des voies de signalisation en aval, ainsi que leurs coopérations ou synergies (revue par (Sansonetti, 2006)).

L'expression spécifique de certains PRR, ainsi que l'environnement tissulaire conditionne l'ensemble de la réponse. A ce jour, seuls les TLR ont fait l'objet d'une étude de leur expression différentielle par les différents types de DC. Nous n'aborderons donc ici que l'expression de cette famille de PRR tout en gardant à l'esprit la complexité sous-jacente encore inexplorée.

Tableau VI : Profils d'expression des TLR par les différentes sous-populations de DC chez l'homme (A) ou chez la souris (B) (d'après (Iwasaki et Medzhitov, 2004)).

A.

	Monocytes	DC fraîchement isolées		DC différenciées *in vitro*
		moDC/iDC	PDC	GM-CSF + IL-4
TLR1	++	++	+	++
TLR2	++	++	-	++
TLR3	-	++	-	++
TLR4	++	-	-	++
TLR5	++	+	-	+/-
TLR6	++	++	++	++
TLR7	+/-	+/-	++	-
TLR8	++	++	-	++
TLR9	-	-	++	-
TLR10	-	+	+	ND

B.

	DC fraîchement isolées				DC différenciées *in vitro*
	$CD4^-CD8^-$	$CD4^+CD8^-$	$CD4^-CD8^+$	PDC	GM-CSF + IL-4
TLR1	++	++	++	++	ND
TLR2	++	++	++	++	ND
TLR3	++	-	++	-	ND
TLR4	+/-	+/-	+/-	+/-	++
TLR5	++	++	-	+	ND
TLR6	++	++	++	+	ND
TLR7	++	++	-	++	ND
TLR8	++	++	++	++	ND
TLR9	++	++	++	++	++

ND : non disponible

Chez l'homme comme chez la souris, les différentes sous-populations de DC occupant les différentes niches sont définies par leur localisation anatomique et par leur capacité à répondre à certains types de pathogènes *via* l'expression différentielle de TLR (Tableau VI). Il est notable que la reconnaissance des motifs pathogènes est dégénérée et les PRR redondants. Cette complexité de l'expression différentielle des PRR, ainsi que la redondance du système de reconnaissance par les différentes populations de DC contrôle la spécificité de la réponse (revue par (Pulendran, 2005)).

Il a été montré, dans le poumon murin, qu'une stimulation des DC avec des faibles doses de LPS induit une réponse Th2 et une inflammation allergique tandis qu'une stimulation des mêmes DC avec une forte dose de LPS conduit à une réponse Th1 (Eisenbarth *et al.*, 2002). Physiologiquement, une dose élevée de LPS correspondrait aux quantités présentes lors d'une infection par des bactéries Gram-négatives. Il apparaît donc que l'induction d'une réponse Th2 TLR4-dépendante après inhalation de faibles doses de LPS représente un mécanisme associé à l'asthme, tandis que l'induction d'une réponse Th1 TLR4-dépendante après une infection par des bactéries Gram-négatives représente un mécanisme de protection associé à l'infection (pour revue, (Iwasaki et Medzhitov, 2004)).

Les études des sous-populations de DC isolées chez l'homme et chez la souris montrent que les TLR ont un profil d'expression différent selon chaque sous-population (Tableau VI) (Iwasaki et Medzhitov, 2004). Ces profils d'expression ouvrent certaines questions quant à la fonction de reconnaissance des pathogènes par les différentes sous-populations de DC. Ainsi, les PDC sont des détecteurs très efficaces des infections virales *via* l'expression de TLR7 (Diebold *et al.*, 2004) et TLR9 (Lund *et al.*, 2003) chez la souris. L'expression de TLR4 par les sous-population de DC chez la souris est controversée mais l'absence de réponse des DC fraîchements purifiées à une infection par du LPS *in vitro* peut s'expliquer par l'absence d'expression de TLR4 tandis que les DC obtenues *in vitro* expriment fortement TLR4 et répondent à l'infection (Boonstra *et al.*, 2003).

2.3.4. Les cellules dendritiques pulmonaires

2.3.4.1. Les DC pulmonaires chez le rat

Historiquement, les DC pulmonaires (DCpulm) ont été décrites pour la première fois chez le rat. Dès 1988, Holt observe la présence de cellules CMH classe II-positives avec une morphologie caractéristique des DC au niveau de l'épithélium respiratoire et de la paroi septale alvéolaire des voies respiratoires du rat mais pas dans les lavages bronchio-alvéolaires où il ne détecte la présence que de macrophages (Holt *et al.*, 1988). En 1991, il montre que ces DCpulm sont présentes dans l'ensemble de l'épithélium pulmonaire et composent, avec les macrophages alvéolaires, la première ligne de défense dans la surveillance des antigènes inhalés (Schon-Hegrad *et al.*, 1991). Il dénombre chez le rat une densité de 600 à 800 DCpulm par mm^2 à la surface de l'épithélium des bronches pulmonaires et environ 75 dans l'épithélium alvéolaire (Schon-Hegrad *et al.*, 1991). Ce réseau est très proche de celui formé par les cellules de Langerhans présentes dans la peau (Holt *et al.*, 1990 ; Holt *et al.*, 1994). Une étude complémentaire sur le taux de renouvellement des DCpulm montre une demi-vie inférieure à 2 jours comparée à une demi-vie supérieure à 15 jours pour les LC (Holt *et al.*, 1994). La seule demi-vie aussi « courte » observée pour des DC interstitielles est celle des DC intestinales (Pugh *et al.*, 1983 ; Fossum, 1989), ce qui indiquerait qu'un rapide taux de renouvellement de la population des DC est un phénomène principalement rencontré au niveau des muqueuses.

Il démontre aussi l'importante capacité de ces DCpulm à induire l'activation antigène-spécifique des cellules T *in vitro* après stimulation comparativement aux MA, beaucoup moins efficaces dans ce domaine (Holt *et al.*, 1988).

Récemment, l'équipe de Holt a montré que l'efficacité de capture des Ag inhalés par les DCpulm au niveau de la trachée et la migration des DCpulm jusqu'aux ganglions lymphatiques est augmentée en présence de stimuli bactériens (Jahnsen *et al.*, 2006). Ils montrent que la cinétique de migration est rapide (30 min) et suggèrent que la capture des éléments bactériens s'effectue par la production d'extensions cytoplasmiques par les DCpulm à travers les cellules épithéliales comme l'a démontré Niess *et al.* dans l'intestin (Niess *et al.*, 2005).

2.3.4.2. Les DC pulmonaires chez la souris

Chez la souris, les DCpulm sont présentes dans tous les compartiments pulmonaires incluant les voies respiratoires (trachée, arbre bronchique et alvéoles), le parenchyme, la plèvre et le système vasculaire pulmonaire (Figure 19) (pour revues, (Lipscomb et Masten, 2002 ; Lambrecht et Hammad, 2003)).

Les différentes sous-populations de DCpulm sont difficiles à caractériser car elles ont un phénotype très proche d'autres cellules pulmonaires telles que les MA. De plus, (i) les DCpulm sont difficilement accessibles car rares dans les LBA (van Rijt *et al.*, 2004), leur obtention nécessite une digestion enzymatique des poumons conduisant à un mélange de DCpulm myéloïdes (bronchiales, interstitielles et alvéolaires) et de PDC ; (ii) elles représentent moins de 1% des cellules pulmonaires totales (Gonzalez-Juarrero et Orme, 2001 ; Vermaelen et Pauwels, 2004) les MI représentant plus de 3% des cellules (Vermaelen et Pauwels, 2004) ; (iii) les méthodes de séparation cellulaire induisent fréquemment une activation des DCpulm ; (iv) les DCpulm ne peuvent pas être identifiées phénotypiquement par un seul marqueur (Tableau VII) (Vermaelen et Pauwels, 2004).

Deux grands types de DCpulm sont décrits : les DCpulm myéloïdes et les PDC.

Toutes les DCpulm myéloïdes expriment les marqueurs membranaires CD11c et CD11b ainsi qu'un niveau intermédiaire à fort des molécules du CMH II. Selon leur localisation, elles expriment d'autres marqueurs de surface permettant de les distinguer en trois sous-populations : les DCpulm myéloïdes bronchiales, interstitielles et alvéolaires (Tableau VII).

Au niveau des bronches, les DCpulm myéloïdes bronchiales forment un réseau dense au sein de l'épithélium. Elles expriment les molécules CMH II et le CD11b ainsi qu'un niveau faible à intermédiaire du DEC205. Ces DCpulm myéloïdes bronchiales n'expriment pas le CD8α, ni le marqueur Gr1 (Vermaelen et Pauwels, 2004).

Les DCpulm myéloïdes interstitielles, situées dans l'interstitium alvéolaire, sont principalement des DC immatures n'exprimant pas les molécules de co-stimulation CD80, CD86 ou CD40 et faiblement les molécules du CMH II (Vermaelen et Pauwels, 2004 ; von Garnier *et al.*, 2005). Aucune DC CD8α^+ ou CD4$^+$ n'ont été décrites dans la population de

DCpulm myéloïdes interstitielles fraîchement isolée. Toutefois, des DCpulm myéloïdes CD8α^+ peuvent être générées après mise en culture de DCpulm myéloïdes interstitielles CD8α^- pendant 12 heures (Swanson *et al.*, 2004 ; Vermaelen et Pauwels, 2004).

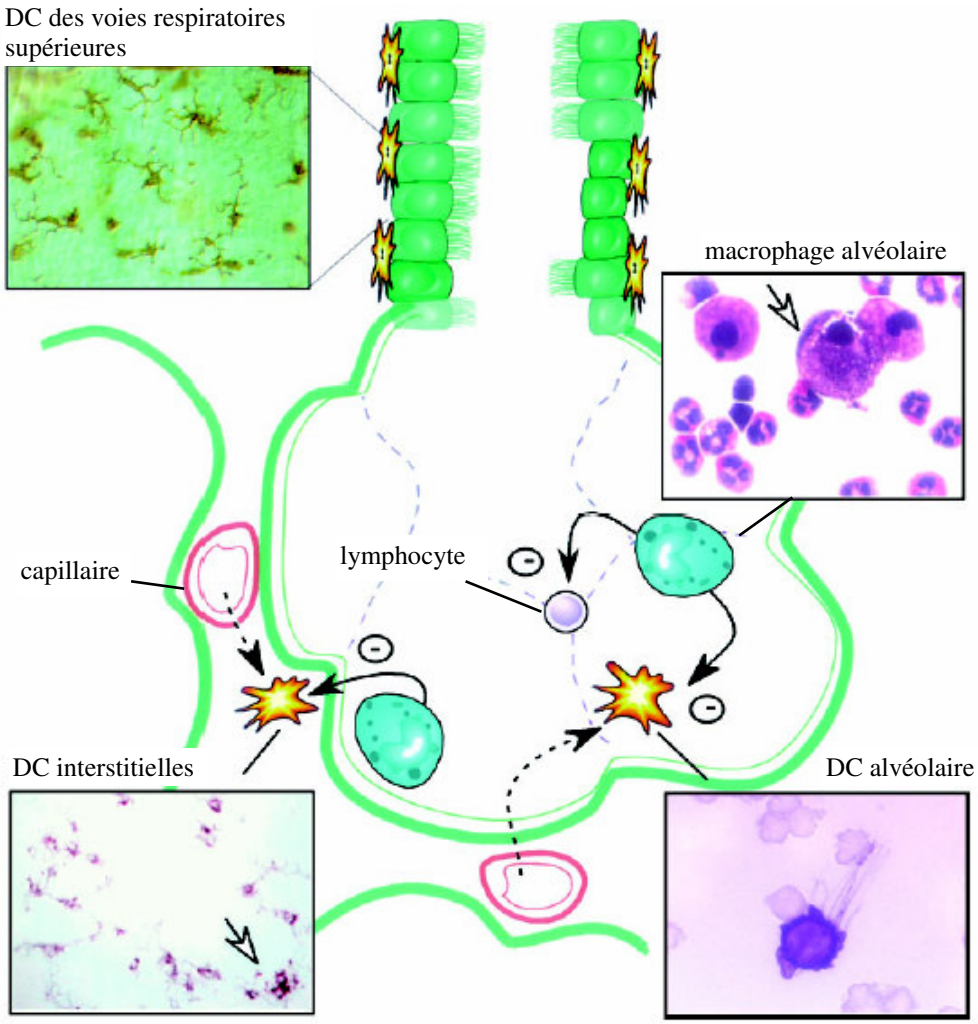


Figure 19 : Distribution des cellules dendritiques pulmonaires chez la souris (d'après (Lambrecht, 2005)).

Les DCpulm myéloïdes présentes dans les alvéoles expriment le marqueur F4/80. Elles capturent les antigènes inhalés et sont capables d'activer les cellules T spécifiques *ex vivo* longtemps après exposition à des antigènes (Julia *et al.*, 2002). Elles expriment aussi le facteur de transcription Runx3 qui est un composant essentiel de la cascade de signalisation TGFβ impliquée dans l'inhibition de la maturation des DC (Fainaru *et al.*, 2004).

Une sous-population de DCpulm myéloïdes exprimant l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ et distinct des DCpulm myéloïdes interstitielles a récemment été décrite (Sung *et al.*, 2006). Les αE-DC sont

présentes dans l'interstitium pulmonaire, dans les alvéoles et au niveau de la paroi vasculaire pulmonaire. Ces DCpulm expriment les molécules CMH II et le CD11c fortement ainsi que le marqueur CD103, spécifique de la sous-unité α_E de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ (Sung *et al.*, 2006). Elles expriment aussi les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 ainsi que des protéines des jonctions serrées telles que les Claudine-1 et -7 et ZO-2 (Sung *et al.*, 2006). L'expression de ces molécules pourrait leur permettre de créer des extensions trans-épithéliales ou de migrer à travers la barrière épithéliale dans les alvéoles pour capturer les Ag comme cela a été décrit pour les DC intestinales (Rescigno *et al.*, 2001).

Enfin, des travaux récents ont démontré la présence d'une petite population de PDC $B220^+$ $Gr1^+$ $mPDCA\text{-}1^+$ au niveau du tissu pulmonaire et exprimant le marqueur spécifique 120G8 (Asselin-Paturel *et al.*, 2003 ; von Garnier *et al.*, 2005). Les PDC représentent seulement 0,15% des cellules du parenchyme pulmonaire (von Garnier *et al.*, 2005). Elles expriment un niveau plus faible de molécules CMH II comparativement aux DCpulm myéloïdes mais expriment un fort taux de la molécule inhibitrice PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) (de Heer *et al.*, 2004), connue pour inhiber l'activation des cellules T en interagissant avec PD-1 (Brown *et al.*, 2003). Ce profil d'expression, associé à une faible capacité de stimulation des cellules T *ex vivo* (de Heer *et al.*, 2004), favorise le potentiel tolérogène des PDC pulmonaires.

2.3.4.3. Les DC pulmonaires chez l'homme

Chez l'homme, Les premières DCpulm furent décrites en 1989 (Nicod *et al.*, 1989). Les DCpulm humaines sont principalement observées au niveau de l'épithélium et du tissu sub-épithélial des bronches et des bronchioles, et constituent environ 1% du contingent cellulaire (Sertl *et al.*, 1986). Trois sous-populations de DCpulm ont été décrites : deux sont d'origine myéloïde et expriment le marqueur CD11c mais varient dans l'expression des marqueurs BDCA-1 (ou CD1c) et BDCA-3, constituant les DCpulm myéloïdes de type 1 (DCm1) et 2 (DCm2), respectivement (Demedts *et al.*, 2005 ; Tsoumakidou *et al.*, 2006) ; et une sous-population de PDC qui n'expriment pas le CD11c mais qui expriment les marqueurs BDCA-2 et/ou BDCA-4 ainsi que le récepteur à IL-23, CD123 (Tableau VII) (Colonna *et al.*, 2004 ; Demedts *et al.*, 2005 ; Tsoumakidou *et al.*, 2006).

Tableau VII : Phénotype des DCpulm chez le rat, la souris et l'homme.

	Fonction	Niveau d'expression					
		Rat	Souris		Homme		
			mDC	PDC	DCm1	DCm2	PDC
Marqueurs d'activation							
CD40	molécules de co-stimulation	ND	-	-	+/-	+/-	-
CD80		+/-	+/-	-	+	+/-	-
CD86		+/-	+/-	-	+	+	+/-
F4/80	marqueur d'activation des macrophages	NA	-	ND	NA	NA	NA
CMH II	présentation d'Ag	++	+	+/-	+++	+++	+++
CD1a		NA	NA	NA	-	-	+
CD1d		NA	+	ND	NA	NA	NA
Marqueurs de lignage							
BDCA-1 (CD1c)	marqueurs de lignée des DC dérivées du sang	NA	NA	NA	++	-	-
BDCA-2		NA	NA	NA	-	-	++
BDCA-3		NA	NA	NA	-	++	-
BDCA-4		NA	NA	NA	-	-	++
CD11a	molécule d'adhérence intercellulaire	NA	++	ND	NA	NA	NA
CD11b	interactions cellulaires/adhérence (intégrines)	+++	++	-	+	+	-
CD11c		+++	+++	+/-	++	++	-
CD103		NA	+/-	-	NA	NA	NA
CD4	récepteurs associés au TCR	+++	-	-	+++	+++	ND
CD8α		-	+/-	-	-	-	ND
CD54 (ICAM-1)	molécule d'adhérence	++	+++	ND	++	++	++
CD71	récepteur des transferrines	NA	NA	NA	+	+	ND
CD123	récepteur de l'IL-23	ND	ND	ND	ND	ND	++
DEC205 (CD205)	récepteur multilectines	ND	+/-	-	ND	ND	ND
DC-SIGN (CD209)	ND	NA	NA	NA	+	+	ND
mPDCA-1	ND	NA	-	++	NA	NA	NA
Gr1 (Ly6C et Ly6G)	ND	ND	-	++	ND	ND	ND
CD45R/B220	ND	ND	-	++	ND	ND	ND
120G8	ND	NA	-	++	NA	NA	NA
Capacités de stimulation des cellules T							
	Réaction lymphocytaire mixte	+	+++	+	+++	+++	+++

ND : non disponible
NA : non applicable

De plus, une faible quantité de DCpulm (moins de 1%) est observée dans les LBA (van Haarst *et al.*, 1994a). Une petite sous-population de ces DCpulm (environ 20%) exprime le marqueur caractéristique des LC, le CD1a, et possède de fortes capacités de stimulation des cellules T *in vitro* couplées à une faible production de cytokines pro-inflammatoires (Havenith *et al.*, 1994 ; van Haarst *et al.*, 1994b ; van Haarst *et al.*, 1996). Cette population $CD1a^+$ représente un contingent de PDC (van Haarst *et al.*, 1996). La deuxième sous-population de DCpulm présente dans les LBA possède les caractéristiques des DC dérivées de monocytes avec une capacité moyenne de stimulation des cellules T *in vitro* associée à une forte production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF-α (van Haarst *et al.*, 1996).

2.3.5. Fonctions des DCpulm dans la réponse immune primaire aux antigènes inhalés

Les DC jouent un rôle important dans les régulations immunes par le lien qu'elles établissent entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Pour cela les DCpulm doivent (i) être recrutées en permanence au niveau des poumons, (ii) être capable de reconnaître et de capturer les antigènes inhalés et (iii) migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques afin de présenter l'antigène apprêté aux cellules T naïves et induire une réponse immune spécifique.

2.3.5.1. Recrutement des DC au sein des poumons

En condition d'homéostasie, les DCpulm forment un réseau dense de cellules dans l'interstitium pulmonaire. Des DC, ou leurs précurseurs, sont en permanence recrutés depuis la circulation sanguine vers les poumons afin de régénérer le pool de DCpulm ayant migré jusqu'aux ganglions médiastinaux. Les DCpulm sont donc sans cesse renouvellées (pour revue, (Vermaelen et Pauwels, 2005)).

Les DCpulm humaines fraîchement isolées expriment les récepteurs CCR1 et CCR5 (Cochand *et al.*, 1999) dont les ligands, CCL5 et/ou CCL3 sont des chimiokines produites au

niveau du tissu pulmonaire (Stumbles *et al.*, 2001). Chez la souris, les récepteurs CCR2 et CCR6 sont nécessaires à l'accumulation progressive des DC dans les poumons en réponse à un antigène (Osterholzer *et al.*, 2005). De plus, les cellules épithéliales alvéolaires recrutent indirectement les DC en sécrétant des défensines, petits peptides possédant une activité bactéricide, produites après contact avec un pathogène (Cole et Waring, 2002). Chez l'homme, la β-défensine 2 interagit avec CCR6, fortement exprimé par les DC immatures (Yang *et al.*, 1999). Enfin, des stimuli non-microbiens peuvent aussi affecter le renouvellement ou le recrutement des DCpulm. Ainsi, des particules ultra-fines induisent la sécrétion de CCL20 par les cellules épithéliales alvéolaires humaines, chimioattractant majeur des DC immatures exprimant CCR6 (Reibman *et al.*, 2003).

Des études chez le rat ont montré que l'inhalation de bactéries ou de particules virales induit un flux rapide de DC au niveau des poumons, dans certains cas dès 2 heures après inhalation (McWilliam *et al.*, 1994). Ce phénomène est spécifique des DCpulm puisqu'aucune accumulation de macrophages ou de lymphocytes n'est observée. De plus, ce recrutement de DC est observé au même moment, ou précède, le recrutement des PNN. Ainsi, le recrutement des DC fait partie intégrante des phases précoces de la réponse immune innée.

L'origine des cellules recrutées n'est pas clairement définie (cellules différenciées en DC ou précurseurs) et la prolifération locale de progéniteurs intra-pulmonaires ne peut être exclue. En effet, le GM-CSF, un facteur de croissance essentiel à la génération de DC à partir de monocytes, est exprimé en quantité significative dans les poumons et sa production est augmentée dans un contexte inflammatoire (Wang *et al.*, 2000). Landsman *et al.* ont montré que la population monocytaire peut se différencier en DCpulm en condition d'homéostasie ou après inflammation (Landsman *et al.*, 2007).

Le renouvellement des DCpulm peut donc être dû (i) à un recrutement de DC sanguines *via* des signaux chimioattractants appropriés (Suda *et al.*, 1998), (ii) à un recrutement de précurseurs sanguins (monocytes) qui se différencient en DCpulm sous l'influence de cytokines sécrétées par les cellules pulmonaires (GM-CSF par exemple) (Wang *et al.*, 2000), (iii) à une prolifération de progéniteurs intra-pulmonaires sous l'action de facteurs de croissances sécrétés par les cellules pulmonaires (GM-CSF ou Flt-3L) (Masten *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2006) ou enfin (iv) à une transdifférenciation des macrophages pulmonaires en DCpulm sous l'influence du GM-CSF (Wang *et al.*, 2000).

2.3.5.2. Capture de l'antigène et migration jusqu'aux ganglions lymphatiques

Les DCpulm sont situées dans le tissu pulmonaire de façon stratégique pour capturer les antigènes ou les pathogènes inhalés. Il a été montré que les DC des muqueuses intestinales, localisées sous l'épithélium, forment des extensions entre les jonctions serrées des cellules épithéliales pour atteindre la lumière et capturer les antigènes (Niess *et al.*, 2005). Lors de ce processus, les DC expriment elles-mêmes des protéines impliquées dans les jonctions serrées afin de conserver l'intégrité de la barrière épithéliale (Niess *et al.*, 2005). Récemment, une étude chez la souris a montré que les αE-DC expriment elles aussi des protéines de ce type telles que la Langerine, les Claudine-1 et -7 ainsi que ZO-2 (Sung *et al.*, 2006). Il est donc possible que les DCpulm, à l'instar des DC intestinales, émettent des expensions cytopasmiques à travers la barrière alvéolaire afin de capturer les antigènes ou les pathogènes inhalés. Toutefois, ce phénomène n'a pas encore été décrit *in vivo* chez la souris même si plusieurs travaux semblent le suggérer (Jahnsen *et al.*, 2006 ; Lambrecht, 2006a ; Sung *et al.*, 2006 ; Landsman *et al.*, 2007).

Des études ont montré que des billes de latex administrées par voie intra-nasale (i.n.) (Jakubzick *et al.*, 2006) ou des macro-molécules administrées par voie intra-trachéale (i.t.) (Vermaelen *et al.*, 2001), fluorescentes et incapables de traverser les jonctions serrées de la barrière épithéliale alvéolaire, sont phagocytées par les DCpulm. Elles sont ensuite retrouvées dans les ganglions lymphatiques thoraciques dès 6 h (Vermaelen *et al.*, 2001) et jusqu'à 2 jours (Jakubzick *et al.*, 2006) *via* un mécanisme CCR7/CCR8-dépendant (Vermaelen *et al.*, 2001 ; Jakubzick *et al.*, 2006). La migration des DCpulm est dirigée par un gradient chimiotactique de CCL19 et CCL21, provenant des vaisseaux lymphatiques et de la zone T des ganglions lymphatiques (Randolph *et al.*, 2005). CCR8, récepteur de la chimiokine CCL-1, agit en association avec CCR7 pour la migration des DCpulm jusqu'aux ganglions médiastinaux (Jakubzick *et al.*, 2006). Par ailleurs, les voies de transduction du signal après activation de CCR7 par CCL19/CCL21 – et donc la migration des DC vers les ganglions lymphatiques qui en résulte – sont contrôlées par des médiateurs lipidiques tels que PGE_2 (Scandella *et al.*, 2004). Ainsi, PGE_2, produit par les cellules épithéliales alvéolaires, pourrait

stimuler la migration CCL19/CCL21-dépendante des DCpulm après exposition à un pathogène. A l'inverse, PGD_2 (prostaglandine D2) inhibe la migration des DCpulm *via* l'activation du récepteur DP1 (*D-prostanoid receptor 1*) (Hammad *et al.*, 2003).

La caractérisation exacte des sous-populations de DCpulm capables de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques après phagocytose n'est pas encore établie. Toutefois, Belz *et al.* ont montré qu'une sous-population particulière de DCpulm migre après infection virale depuis les poumons jusqu'aux ganglions lymphatiques (Belz *et al.*, 2004). Cette sous-population de DCpulm est caractérisée par l'absence d'expression des marqueurs CD8α et CD11b tandis qu'elles expriment les marqueurs CD11c et F4/80. Elles peuvent être une source d'antigène pour les DC $CD8\alpha^+$, résidant dans les ganglions lymphatiques, qui sont alors capables d'induire une prolifération des cellules T naïves.

L'antigène capturé est délivré dans les vésicules endosomales afin d'être apprêté et associé aux molécules du CMH de classe II. Lors de leur migration les DCpulm augmentent l'expression des molécules du CMH II-peptide associé ainsi que celle des molécules de co-stimulation telles que CD40 et CD86. Il a été montré que les DCpulm, après capture de l'antigène à la périphérie et migration jusqu'aux ganglions lymphatiques, pénétrent les zones riches en cellules T des ganglions lymphatiques (Vermaelen *et al.*, 2001). Cette topologie est optimale pour l'activation des cellules T naïves et l'établissement d'une réponse immune spécifique.

2.3.5.3. Régulation de l'activation des DCpulm

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour le maintien des DCpulm à l'état immature et donc pour le maintien de l'état de tolérance dans les poumons (Lambrecht *et al.*, 2001). La sécrétion de médiateurs dans l'environnement tels que l'IL-10, l'IL-1ra, le TGF-β ou le NO, inhibe les fonctions de présentation d'antigène des DCpulm (Holt *et al.*, 1985), de même que l'expression de ligands membranaires (cadhérines épithéliales telle que la E-cadhérine) par les cellules épithéliales (Upham et Stick, 2006). La présence d'expansions nerveuses terminales non-myélinisées dans les espaces intercellulaires inhibent la maturation des DCpulm *via* la sécrétion de neuromédiateurs importants pour la communication entre les systèmes nerveux et immunitaire (Kradin *et al.*, 1997). De plus, la présence des MA est considérée comme un

facteur inhibiteur des DCpulm et une étude récente chez la souris a montré qu'une déplétion des MA résulte en une augmentation du nombre de DCpulm dans les poumons et par voie de conséquence une augmentation de la migration de DCpulm vers les ganglions lymphatiques drainant (Jakubzick *et al.*, 2006).

Récemment, une étude a montré, chez la souris, que les PDC pulmonaires sont capables de capturer des antigènes, de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et d'induire un état de tolérance en générant des cellules T régulatrices (Treg) (pour revue, (Hammad et Lambrecht, 2006)). Ainsi, la déplétion des PDC pulmonaires chez la souris induit une forte réponse de type Th2 après inhalation d'antigènes inoffensifs (de Heer *et al.*, 2004). Le potentiel tolérogène des PDC peut venir de la capacité de ces cellules à produire de l'IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), connue pour son effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T (Fallarino *et al.*, 2004) et dans le cadre des maladies inflammatoires pulmonaires (Hayashi *et al.*, 2004). L'expression d'IDO a récemment été démontrée par les cellules $CD11c^+$ pulmonaires (Swanson *et al.*, 2004), toutefois la sous-population cellulaire exacte qui est impliquée n'est pas clairement définie.

2.3.5.4. Induction d'une réponse pulmonaire protectrice et polarisation de la réponse Th par les DCpulm

Les DCpulm myéloïdes induisent une réponse immunitaire protectrice contre les antigènes inhalés lorsqu'elles sont activées *via* les TLR ou d'autres PRR (pour revue, (de Heer *et al.*, 2005)).

Chez la souris, une infection des voies respiratoires par un virus (*Influenza A*) (Brimnes *et al.*, 2003 ; Legge et Braciale, 2003), une bactérie (*Mycobacterium tuberculosis*) (Marino *et al.*, 2004) ou encore un champignon (*Aspergillus fumigatus*) (Bozza *et al.*, 2002) induit une accélération transitoire de la migration des DCpulm vers les ganglions lymphatiques, associée à la maturation des cellules (augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et/ou CD86 ainsi que des molécules du CMH II). Le même phénomène est observé dans les cas d'exposition à un allergène chez des souris asthmatiques (Vermaelen et Pauwels, 2003).

De plus, une étude a montré qu'une infection virale pulmonaire induit la formation de tissus lymphoïdes organisés dans l'interstitium pulmonaire, localisés au niveau des

bronchioles et en association avec les vaisseaux sanguins (Dahl *et al.*, 2004). Ces structures sont composées de DC, de cellules T et de cellules B, et sont capables de générer une réponse immunitaire protectrice (pour revue, (Kiyono et Fukuyama, 2004)). Toutefois, les mécanismes impliqués dans la formation de ces structures restent à découvrir.

Lorsque les DCpulm atteignent les zones T des ganglions lymphatiques, elles vont instruire les cellules T naïves afin d'établir une réponse immune protectrice. Pour cela, le type de DCpulm engagée ainsi que son état d'activation, la quantité d'antigène capturé et apprêté, de même que les facteurs environnants présents déterminent la nature de la réponse cellulaire T engagée (Figure 20) (Sporri et Reis e Sousa, 2005).

En condition d'homéostasie, les DC maintiennent un état de tolérance face aux antigènes inoffensifs (pour revue, (Steinman *et al.*, 2003)). Pour cela, les DCpulm migrent continuellement jusqu'aux ganglions lymphatiques médiastinaux et présentent des Ag apprêtés et associés aux molécules du CMH II dans un contexte tolérogénique. En effet, il a été montré que, en absence d'infection, les DCpulm sécrètent de l'IL-10 et expriment les molécules ICOS-L (*inducible costimulator ligand*) et DP-L1 favorisant la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules Treg $CD4^+CD25^+$ (Akbari *et al.*, 2003). Les cellules Treg ainsi produites contrôlent l'inflammation en produisant des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF-β.

Lors d'une infection, un des mécanismes permettant la génération de cellules T effectrices en présence de cellules Treg est la forte production d'IL-6 par les DC en réponse à l'activation des TLR après reconnaissance de PAMP (Pasare et Medzhitov, 2003). Après activation des cellules T $CD4^+$, leur différenciation en cellules effectrices Th1 ou Th2 est contrôlée par plusieurs facteurs environnementaux dont les cytokines produites par les DC (pour revue, (Iwasaki et Medzhitov, 2004)).

Une réponse Th1 est caractérisée par la production d'IFN-γ et de TNF-β par les cellules T. Elle est induite après une infection bactérienne ou dans le cadre d'une infection virale. Dans le poumon, l'IL-12 semble jouer un rôle important dans l'établissement de la réponse Th1 (Kuipers *et al.*, 2004). Toutefois, une étude a montré que la réponse Th1 induite par les DCpulm après incubation avec du LPS est indépendante de la sécrétion d'IL-12 par les DCpulm (Kuipers *et al.*, 2003).

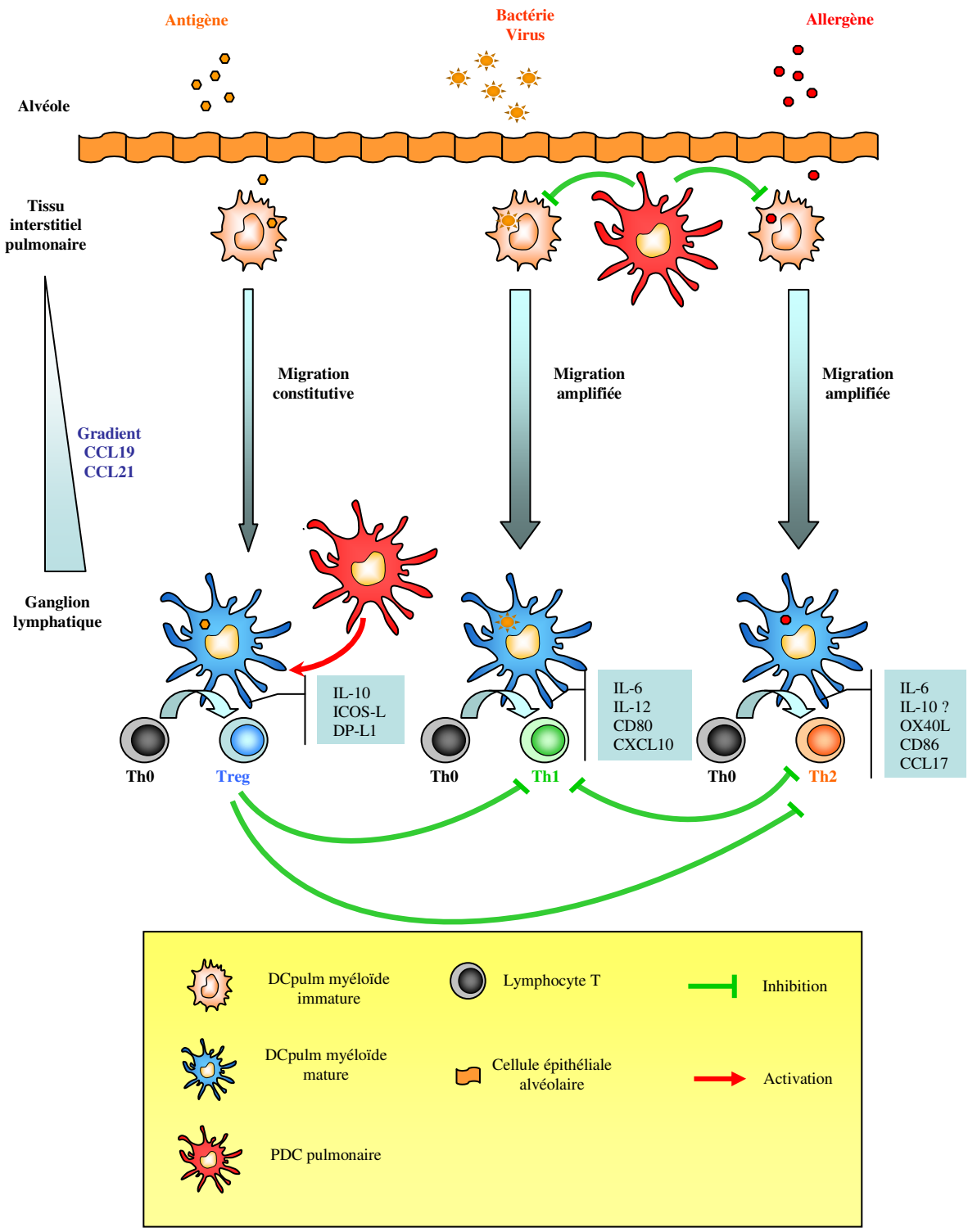


Figure 20 : Diagramme schématique des réponses immunes spécifiques induites par les DCpulm selon les stimuli détectés dans l'air inhalé (adapté d'après (Vermaelen et Pauwels, 2005)).

Il a été montré que les DCpulm ont une forte capacité à induire l'activation de cellules T naïves vers une réponse Th2 (Stumbles *et al.*, 1998 ; Dodge *et al.*, 2003). La polarisation de la réponse Th2 est dirigée par la sécrétion d'IL-6 par les DCpulm en absence d'IL-12 (Dodge *et al.*, 2003). Le rôle joué par l'IL-10 dans l'établissement de ce type de réponse est aujourd'hui controversé. Cette cytokine semble plutôt jouer un rôle dans l'établissement de la tolérance pulmonaire. La différenciation des cellules T $CD4^+$ en cellules de type Th2 est caractérisée par la production de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 par les cellules T effectrices.

Les DCpulm jouent donc un rôle essentiel dans l'échantillonnage des antigènes inhalés ainsi que dans le maintien de la tolérance au sein du poumon. Elles forment un lien direct entre l'immunité innée et adaptative par leur fonction CPA après migration dans les ganglions lymphatiques thoraciques et peuvent ainsi initier une réponse immune adaptative spécifique après infection.

2.4. Cellules recrutées en condition de non homéostasie

Différentes pathologies pulmonaires peuvent conduire à un recutement cellulaire au sein des poumons. Ainsi, une infection bactérienne, une infection virale ou encore une lésion pulmonaire peuvent provoquer un recrutement de monocytes, de granulocytes et/ou de lymphocytes. L'asthme représente une pathologie pulmonaire particulière caractérisée par une inflammation chronique avec une sécrétion excessive de mucus, une congestion de la muqueuse respiratoire et une hyperréactivité des muscles lisses des bronches (pour revue, (Vermaelen et Pauwels, 2005)).

Les monocytes sont des cellules phagocytaires qui peuvent se différencier en MA ou MI ainsi qu'en DC en fonction des stimuli environnementaux (cytokines et facteurs de croissance, M-CSF ou GM-CSF principalement) et selon la sous-population de monocyte recrutée (cf. 2.2.1.1. et 2.3.5.1.). En effet, Landsman *et al.* ont montré que la sous-populaion de monocytes $Gr1^{fort}$ / CX_3CR1^{int} donne naissance aux DCpulm tandis que les monocytes $Gr1^{faible}$ / CX_3CR1^{fort} peuvent se différencier en macrophages pulmonaires ou en DCpulm dans certaines conditions (Landsman *et al.*, 2007). Le recrutement des monocytes est

dépendant de la sécrétion de CXCL2 (ou *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2α) au sein du poumon et une étude a démontré qu'une surexpression de cette chimiokine par les pneumocytes de type 2 entraîne une accumulation de monocytes au niveau des sites de sécrétion (Gunn *et al.*, 1997).

Les PNN sont des cellules de l'immunité innée essentielles, généralement présentes au niveau des capillaires pulmonaires (Mizgerd, 2002). Ils peuvent être recrutés dans les espaces alvéolaires après stimulation et suite à la production de cytokines telles que le TNF-α ou l'IL-1 (Mulligan et Ward, 1992), ou suite à l'expression de molécules telles que *intracellular adhesion molecule* (ICAM)-1 (Qin *et al.*, 1996), ou encore suite à l'expression de chimiokines telles que CXCL2 (Greenberger *et al.*, 1996).

Les cellules T effectrices sont généralement recrutées plus tardivement que les autres cellules de l'inflammation (monocytes et PNN). Leur recrutement sur le site de l'infection nécessite leur activation préalable par les DCpulm dans les ganglions lymphatiques thoraciques puis la migration des cellules T effectrices au site de l'infection. Dans ce cas aussi, la localisation et le moment où sont exprimées les molécules d'adhésion et où sont sécrétées les molécules chimioattractantes sont importants. Les mécanismes mis en jeu dans le recrutement des cellules T effectrices sont très complexes et encore mal connus (Kaiserlian *et al.*, 2005).

Chapitre III

« Physiopathologie du charbon d'inhalation »

1. B. anthracis *et armes biologiques*

B. anthracis fait partie des agents à fort potentiel d'utilisation comme arme biologique : il est classé comme agent biologique de « classe A » dans la classification du CDC, rang comportant les agents biologiques les plus dangereux. Cette classification est basée sur le pouvoir pathogène, la virulence et le niveau de menace que représente l'agent biologique. *B. anthracis* est une bactérie dont la production est simple et peu coûteuse, sa dissémination est aisée et elle peut résister dans l'environnement sous forme de spores. Le taux de mortalité en cas d'infection par inhalation est élevé et, en cas d'attaque à grande échelle, l'impact psychologique sur la population est sévère. *B. anthracis* répond aussi aux critères définis par Rosebury en 1949 dont les principaux sont : une incubation courte, une maladie mortelle pour laquelle aucun vaccin n'est disponible, une aérosolisation possible ainsi qu'un transport et un stockage facile.

L'agent du charbon fait ainsi partie des modèles d'agents bactériologiques militarisables comme en atteste son histoire. En 1936, et malgré les décisions de la Convention de Genève en 1925 interdisant l'utilisation ou la fabrication d'armes chimiques et/ou bactériologiques, les Japonais créent l'unité U731 qui a pour but de tester les effets de plusieurs agents biologiques (dont le bacille du charbon) sur l'homme. En 1941, l'Angleterre expérimente sur des moutons, des bombes chargées de spores en champ libre sur l'île de Gruinard au nord de l'Écosse (Manchee *et al.*, 1982). Des spores viables persisteront jusqu'à la décontamination de l'île par du formaldéhyde en 1986, soit 45 ans plus tard. Dans les années 1950-1960, les États-unis mènent des expériences sur les armes biologiques, incluant les spores de charbon, jusqu'à ce que le président Nixon mette fin à ces programmes en 1969. Ces recherches permirent l'obtention d'un premier vaccin humain acellulaire contre la maladie du charbon (cf. Chapitre I, § 3.5.2.2).

Malgré la convention internationale interdisant les armes biologiques en 1972, l'Union Soviétique a poursuivi la militarisation du bacille du charbon dans le complexe militaro-industriel Biopreparat. En 1979, un accident survenu dans la base militaire de Sverdlovsk (rebaptisée depuis Ekaterinenbourg) disperse un aérosol de spores de charbon, causant une épidémie de charbon pulmonaire avec 96 cas dont 68 mortels dans un premier temps donnés comme des cas gastro-intestinaux (Abramova *et al.*, 1993 ; Meselson *et al.*, 1994). Cet

incident, dû à une explosion ou à une défaillance d'un filtre, démontra le potentiel létal d'un aérosol de spores de charbon sur une ville et confirma la possibilité d'utilisation de ce pathogène comme arme biologique. En 1991, sous la pression des inspecteurs de l'ONU, l'Irak reconnaît que des recherches sur l'utilisation offensive du charbon et le développement d'armes sont conduits au sein du pays (Zilinskas, 1997 ; Shafazand *et al.*, 1999).

Parallèlement à une utilisation militaire classique, une nouvelle menace est apparue ces dernières années : l'utilisation de l'agent du charbon comme arme bioterroriste. C'est en effet une arme accessible et peu coûteuse pour un groupuscule terroriste et un petit laboratoire, même rudimentaire, suffit pour cultiver la bactérie en peu de temps.

En octobre 2001, les États-Unis ont été la cible d'attaques bioterroristes avec l'envoi d'au moins 5 lettres contaminées par des spores de charbon (Inglesby *et al.*, 2002). Au total, 22 cas de charbon ont été rapportés : 11 cas cutanés et 11 cas pulmonaires dont 5 se sont avérés fatals malgré un traitement antibiotique approprié (Jernigan *et al.*, 2001).

2. Physiopathologie du charbon d'inhalation

La physiopathologie de la maladie du charbon reste mal connue encore de nos jours. Le lien entre les évènements moléculaires et la réponse physiologique de l'animal est complexe. L'étude de modèles animaux permet de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une infection par inhalation.

2.1. Premières études et aspects cliniques chez les rongeurs

Dès 1888, Buechner expérimente une infection par inhalation chez le lapin, le cobaye et la souris en plaçant les animaux dans une chambre d'inhalation (Figure 21) (Buechner, 1888). Il démontre ainsi que la dose de spores nécessaire pour obtenir la létalité lors d'une infection par inhalation est plus faible que lors d'une infection par voie gastro-intestinale. Il effectue une cinétique de prélèvements de tissu pulmonaire afin de retrouver le site de germination et de multiplication des spores avant leur passage dans la circulation sanguine (Buechner, 1888). Il ne trouve qu'un seul agrégat de formes végétatives au niveau de l'arbre pulmonaire sur une seule coupe de tissu et ne remarque aucune lésion pulmonaire.

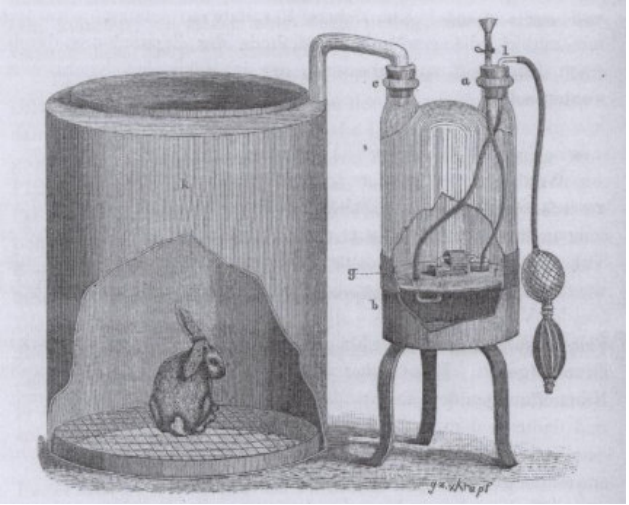


Figure 21 : Système expérimental d'infection par inhalation chez le lapin (d'après (Buechner, 1888))

2.1.1. Physiopathologie chez le cobaye

Les cobayes sont particulièrement sensibles à une infection par inhalation avec des spores virulentes de *B. anthracis* exprimant la capsule et les toxines (Tableau VIII).

En 1957, Ross étudie une cinétique de germination et de prolifération des spores après infection par voie i.t. dans un modèle cobaye avec des spores virulentes (Ross, 1957). Une coloration au « carbol fuchsine » chaud lui permet de discerner les spores dormantes (colorées

en rouge) des spores en phase de germination et des formes végétatives (toutes deux colorées en bleu). Il démontre ainsi l'importance des phagocytes pulmonaires dans l'élimination des spores au niveau des alvéoles. Les spores sont phagocytées en une heure et transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques *via* les vaisseaux lymphatiques où elles sont retrouvées dès 4 heures. Il note que l'infection résulte de la prolifération extracellulaire des formes végétatives dans les ganglions lymphatiques. Après 24 heures, il observe une prolifération des bacilles dans le sang. De la même façon que Buechner et Barnes, il n'observe aucun recrutement de PNN ni de lésions au niveau du tissu pulmonaire.

C'est seulement quelques heures avant la mort de l'animal que des bacilles sont retrouvés dans les poumons, conséquence d'une infection secondaire faisant suite à l'infection systémique et à la propagation des bactéries dans la circulation sanguine.

2.1.2. Physiopathologie chez la souris

En 1986, Welkos *et al.* observent, pour différentes souches de souris, une différence de sensibilité à l'infection sous-cutanée avec des spores de *B. anthracis* de souches virulentes ou atténuées (Welkos *et al.*, 1986). Ces différentes de sensibilités sont retrouvées après une infection par inhalation avec des spores de *B. anthracis* de souches virulentes (Lyons *et al.*, 2004).

Mais les premières données anatomopathologiques datent de 1947 où Barnes observe, comme Ross chez le cobaye, que les animaux de laboratoire (lapin, cobaye et souris) infectés par des spores virulentes cap^+/tox^+ de *B. anthracis* par aérosol ne présentent de symptômes pulmonaires que quelques heures avant leur mort (Barnes, 1947). Il remarque que la quantité de spores présente dans les poumons diminue rapidement dans les 24 heures qui suivent l'infection (Tableau VIII). Il ne détecte aucune forme végétative de la bactérie au niveau des poumons et le nombre de spores retrouvées dans les ganglions lymphatiques 24 heures après infection est faible et très variable entre individu. Il suggère que les spores sont détruites au sein même des poumons, ou bien qu'elles quittent les poumons par une autre voie que la circulation lymphatique. Une hypothèse est qu'elles atteignent les ganglions lymphatiques et sont rapidement détruites, ou encore qu'elles passent rapidement dans la circulation sanguine depuis les ganglions (Barnes, 1947). Il parvient toutefois à démontrer que les poumons ne constituent pas un site de germination et de prolifération pour les spores de *B. anthracis*, à

l'inverse des ganglions lymphatiques qui constituent un site privilégié de germination et de prolifération des spores. Ces études sont les premières à démontrer une implication directe du système lymphatique dans la propagation du pathogène, sans lésions apparentes des poumons.

Lyons *et al.* observent des spores dans les ganglions lymphatiques drainant dès 5 heures après infection par voie i.t. avec une souche virulente (Lyons *et al.*, 2004). La dissémination du pathogène est caractérisée par l'observation de bacilles dans la rate à 48 heures. Des lésions vasculaires au niveau des poumons sont observées 48 heures après infection, avec présence de bacilles dans l'interstitium pulmonaire mais absence d'inflammation apparente du parenchyme pulmonaire. Un lien étroit est établi entre la présence de bacilles dans l'interstitium pulmonaire et dans la rate, démontrant que la présence de bacilles au sein des poumons résulte d'une infection secondaire faisant suite à l'infection systémique et à la prolifération du pathogène. Une nécrose sévère et une hémorragie sont ensuite détectées au niveau de la rate. La mort survient 2 à 3 jours après infection (Lyons *et al.*, 2004).

Plusieurs travaux ont montré le rôle important de la capsule dans la dissémination de *B. anthracis* chez la souris (Lyons *et al.*, 2004 ; Drysdale *et al.*, 2005 ; Heninger *et al.*, 2006). Ainsi, une délétion du plasmide pXO2, portant les gènes codant pour la synthèse de la capsule, diminue considérablement les capacités de dissémination du pathogène après infection par inhalation (Drysdale *et al.*, 2005). Plusieurs travaux, utilisant la forme capsulée, décrivent des formes végétatives dans la rate dès 24-48 heures après infection à la fois avec des souches produisant la capsule et sécrétant les toxines (Lyons *et al.*, 2004 ; Drysdale *et al.*, 2005) et avec des souches capsulées et atoxinogènes (Heninger *et al.*, 2006) tandis qu'aucune dissémination n'est observée avec une souche acapsulée (Drysdale *et al.*, 2005). Ces résultats confirment que la capsule est nécessaire à la dissémination de *B. anthracis* et que les poumons ne constituent pas le site de germination et de prolifération du pathogène.

Tableau VIII : Étude de la cinétique d'infection chez les rongeurs après infection par inhalation de spores de *B. anthracis*.

Espèce	Souche de *B.anthracis*	voie d'infection	DL_{50}	Cinétique d'infection					Référence
				Poumons	Ganglions lymphatiques	Sang	Rate	Mort	
lapin cobaye souris	ND (cap^+/tox^+)	i.n.	300000 185000 700000	Diminution du nb de spores jusqu'à 24h Pas de bacille	24h : nb de spores faible et variable	48h : pas de spore et/ou bacille mis en évidence		7 jours	(Barnes, 1947)
cobaye	M.36 (cap^+/tox^+)	i.t.	50000	35min : spores phagocytées 24h : Pas de bacille	4h : spores dans les phagocytes, pas de spore libre 18h : bacilles 24h : prolifération	24h : prolifération de bacilles	ND	ND	(Ross, 1957)
souris BALB/c	Ames (cap^+/tox^+)	i.n. i.t.	37000 50000	24h : lésions pas d'inflammation 48h : présence de bacilles dans le septum	5h : dissémination très variable entre individus	ND	48h : dissémination des bacilles	2-3 jours	(Lyons *et al.*, 2004)
souris BALB/c	UT500 (cap^+/tox^+)	i.t.	1000	3h : 95% de formes végétatives	ND	ND	24h : dissémination des bacilles 72h : nécrose étendue et hémorragie	6 jours (à 10 x DL_{50})	(Drysdale *et al.*, 2005)
Souris BALB/c	UT500 (cap^+/tox^+)	i.t.	10000	48-72h : présence de bacilles	ND	ND	24h : dissémination des bacilles	2-3 jours	(Heninger *et al.*, 2006)

ND : non disponible.
cap^+/tox^+ : souche virulente produisant la capsule et sécrétant les toxines (LT et ET).
i.n. : intra-nasal.
i.t. : intra-trachéal.
DL_{50} : dose létale induisant 50% de mortalité.
nb : nombre

2.2. Données anatomopathologiques chez les primates non-humains :

Les études portent principalement sur des observations *post-mortem* (entre 2 et 10 jours après infection) et les données observées aux temps précoces restent rares (Lincoln *et al.*, 1965).

Des études ont montré que des chimpanzés exposés à un aérosol d'environ 50000 spores d'une souche virulente présentent des symptômes caractéristiques seulement quelques heures avant leur mort (Albrink et Goodlow, 1959 ; Vasconcelos *et al.*, 2003).

Plusieurs études sur des modèles de primates non-humains infectés par aérosols confirment que les spores sont phagocytées par les cellules alvéolaires et transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques dans les 18 heures qui suivent l'infection (Henderson *et al.*, 1956 ; Albrink et Goodlow, 1959 ; Lincoln *et al.*, 1965). La germination des spores a lieu dans les ganglions lymphatiques et non dans les poumons (Henderson *et al.*, 1956). Des bacilles sont observés dans les ganglions lymphatiques environ 12 heures avant leur détection dans le sang (Lincoln *et al.*, 1965). La septicémie s'établit 8 heures après l'observation des premiers bacilles dans le sang (Lincoln *et al.*, 1965). Les différentes études montrent que les lésions observées après infection sont similaires entre les différentes espèces de primates non-humains telles que les singes rhésus (Fritz *et al.*, 1995) et cynomolgus (Vasconcelos *et al.*, 2003) et avec celles observées chez l'homme (Abramova *et al.*, 1993).

2.3. Données anatomopathologiques chez l'homme :

Tous ces modèles animaux présentent de fortes similitudes avec les données anatomopathologiques observées chez l'homme.

Les analyses des rares cas humains de charbon d'inhalation naturels (Albrink et Goodlow, 1959 ; Albrink *et al.*, 1960 ; Brachman, 1961) ou provoqués (accident de Sverdlosk, 1979 ; attaques à l'automne 2001 aux Etats-Unis) rapportent que les phagocytes chargés de spores s'accumulent au niveau des ganglions lymphatiques, site où les spores germent et où les bacilles prolifèrent (Grinberg *et al.*, 2001 ; Jernigan *et al.*, 2001). Chez les

patients ayant développé un charbon pulmonaire, les étude *post-mortem* montrent que les ganglions lymphatiques médiastinaux sont hémorragiques et nécrosés (Abramova *et al.*, 1993 ; Grinberg *et al.*, 2001 ; Jernigan *et al.*, 2001). Un rapport montre que les lésions observées au niveau des ganglions sont plus étendues que les autres sites d'infection (Grinberg *et al.*, 2001). Les bactéries se propagent ensuite dans la circulation sanguine avec pour conséquence une septicémie et une toxémie. Des lésions au niveau intestinal sont aussi notées mais proviennent d'une dissémination du pathogène *via* la circulation sanguine étant donné que les ganglions lymphatiques mésentériques ne présentent pas de lésions apparentes (Abramova *et al.*, 1993).

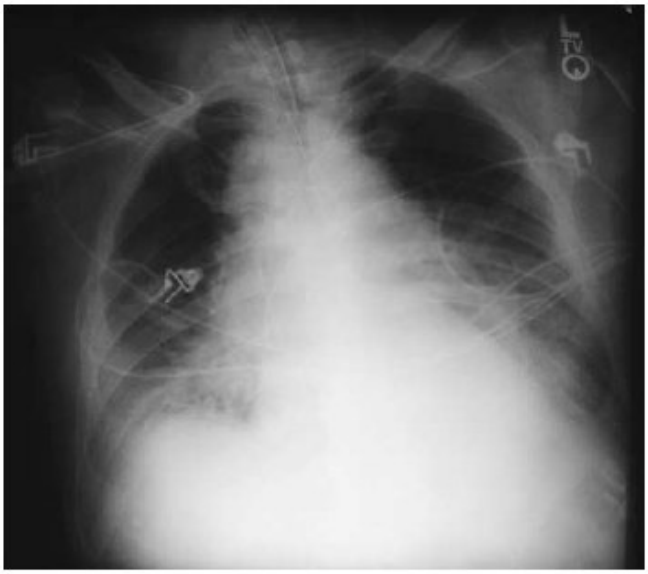


Figure 22 : Radiographie thoracique antéropostérieure d'un patient ayant développé la forme pulmonaire de la maladie du charbon suite aux attaques bioterroristes de 2001. L'élargissement médiastinal caractéristique de la forme pulmonaire est clairement visible ainsi qu'un épenchement pleural (d'après (Bush *et al.*, 2001)).

Les attaques bioterroristes de l'automne 2001 aux États-Unis ont fait ressurgir la gravité d'une infection par voie respiratoire et les méconnaissances des mécanismes immunitaires impliqués. Plusieurs cas ont été précisément décrits (Borio *et al.*, 2001 ; Jernigan *et al.*, 2001 ; Mayer *et al.*, 2001 ; Barakat *et al.*, 2002) et ont permis de mieux connaître les symptômes conduisant au diagnostique clinique du charbon pulmonaire : toux et vomissements associés à un élargissement médiastinal observé par radiographie et sur un scanner thoracique (Figure 22) (Bush *et al.*, 2001 ; Kyriacou *et al.*, 2004). Ces symptômes reflètent la migration massive de phagocytes pulmonaires jusqu'aux ganglions lymphatiques

médiastinaux conduisant à une hypertrophie des ganglions hilaires associée à des épanchements pleuraux (Guarner *et al.*, 2003).

3. Modèle actuel du charbon d'inhalation

Trois étapes majeures peuvent être décrites durant une infection par inhalation : (i) une phase invasive au sein des poumons durant laquelle les toxines ont des effets à courte distance sur les phagocytes pulmonaires principalement ; (ii) une phase de prolifération des bacilles dans les ganglions lymphatiques avec un effet local des toxines ; et enfin, (iii) une phase terminale de diffusion caractérisée par un taux élevé de bactéries dans le sang et des effets à longue distance des toxines conduisant à la mort de l'hôte (voir Annexe I, (Tournier *et al.*, 2007)). Cependant, peu de données concernant ces différentes étapes sont actuellement disponible après infection par inhalation chez l'homme et chez l'animal.

3.1. Charbon d'inhalation : phases précoces de l'infection

Lors d'une infection par inhalation, les spores pénètrent jusqu'aux alvéoles et les mécanismes mis en jeu pour le passage de ces spores, immobiles, à travers la barrière épithéliale alvéolaire restent inconnus et les cellules impliquées ne sont pas encore bien identifiées. De plus, les études *in vivo* chez la souris montrent que de nombreux bacilles sont retrouvés au niveau des ganglions lymphatiques 5 heures après infection tandis que seules des spores sont retrouvées au niveau du poumon jusqu'à deux jours après infection (Lyons *et al.*, 2004). La germination des spores au niveau des poumons reste très limitée et aucun bacille n'est observé avant la pathologie systémique liée à la dissémination du pathogène (Lyons *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que les spores sont rapidement transportées depuis les alvéoles jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants mais les cellules participant au transport des spores ne sont pas caractérisées.

Les principaux travaux *in vitro* sur les interactions phagocytes pulmonaires-*B. anthracis* portent sur l'implication des MA (Guidi-Rontani *et al.*, 1999 ; Cote *et al.*, 2004), population majoritaire des LBA et donc de l'espace alvéolaire (Vermaelen et Pauwels, 2004). Une autre étude a montré que les spores de *B. anthracis* germent dans les phagolysosome des MA (Guidi-Rontani *et al.*, 1999). Les MA ont alors été proposés pour jouer le rôle de « cheval de Troie » lors de l'infection (Guidi-Rontani, 2002).

Une étude plus récente a montré que la déplétion des macrophages pulmonaires par du clodronate induit une persistance des spores au niveau des alvéoles (forte concentration dans les LBA) et une germination des spores au niveau du tissu pulmonaire 48 heures après infection (Cote *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que les MA pourraient donc jouer un rôle dans l'inhibition de la germination des spores au sein même des poumons. A l'inverse, une déplétion des PNN n'induit aucune modification dans l'élimination des spores ni leur germination au niveau du tissu pulmonaire (Cote *et al.*, 2006). Les PNN semblent donc jouer un rôle secondaire dans la dissémination du pathogène et l'élimination des spores.

Les DCpulm constituent une autre population d'intérêt pouvant jouer un rôle important dans les phases précoces de l'infection par leur capacité de migration jusqu'aux ganglions lymphatiques, caractéristique absente chez les MA (cf. Chapitre II). Les DCpulm ont une forte capacité de migration vers les ganglions lymphatiques thoraciques comparativement aux MA (Jakubzick *et al.*, 2006) et leur capacité de migration est augmentée au cours d'une infection bactérienne pulmonaire (Jahnsen *et al.*, 2006). Cela pourrait se traduire *in vivo* par une augmentation de la migration des DCpulm vers les ganglions lymphatiques thoraciques après phagocytose de spores de *B. anthracis*.

Le rôle de ces deux types cellulaires dans le transport des spores jusqu'aux ganglions lymphatiques n'a encore jamais été démontré *in vivo*.

3.2. Inhibition de la réponse immune adaptative et diffusion du pathogène

Lors de la migration des phagocytes pulmonaires infectés vers les ganglions lymphatiques, un certain nombre de spores peuvent germer dans le phagosome, comme cela a pu être montré *in vitro* sur des MA murins (Guidi-Rontani *et al.*, 1999) et c'est à partir des ganglions lymphatiques que le pathogène se propage dans tout l'organisme. Aucune donnée, *in vivo* ou *ex vivo*, concernant la germination des spores au sein des DCpulm n'est disponible.

Le rôle de l'immunité adaptative dans le charbon d'inhalation est controversé du fait de la rapidité de l'infection (Starnbach et Collier, 2003). Les patients ayant développé un charbon pulmonaire après les attaques bioterroristes de 2001 ne présentaient pas d'Ac anti-PA détectable dans les premiers prélèvements sanguins et n'ont donc pas développé de réponse spécifique (Quinn *et al.*, 2004). Toutefois, une étude récente démontre, par l'analyse de tests cellulaires, que l'exposition à des spores induit une réponse immune dose-dépendante chez les patients (Doolan *et al.*, 2007) Les toxines sécrétées pourraient jouer un rôle à ce niveau de l'infection, les ganglions lymphatiques thoraciques étant le site de présentation de l'antigène aux cellules T naïves par les DC. Ainsi, le lien entre l'immunité innée et la réponse immune adaptative n'aurait plus lieu si la fonction CPA des DC était inhibée. Toutefois, les données *in vivo* ou *ex vivo* sur les effets des toxines sur la fonction CPA des DCpulm sont absentes.

La phase terminale du charbon d'inhalation est corrélée aux effets des toxines après diffusion du pathogène dans la circulation sanguine. C'est durant cette phase, qui précède la mort de l'hôte, que de nombreux bacilles sont observés dans le sang ainsi que dans la rate et les poumons chez la souris (Tableau VIII) (Lyons *et al.*, 2004 ; Drysdale *et al.*, 2005). Les formes végétatives produisent de grandes quantités de toxines dont les effets ont été largement étudiés après injection i.v. dans plusieurs modèles *in vivo*. Toutefois les études physiopathologiques après infection par inhalation avec une souche virulente sont rares et souvent anciennes.

Lorsque la phase tardive, correspondant à une toxémie sévère, est atteinte, aucun traitement antibiotique n'est efficace car il ne permet pas la neutralisation des toxines. C'est pourquoi une meilleure compréhension des phases précoces de la maladie semble nécessaire afin de développer des stratégies thérapeutiques mieux adaptées dans le cadre d'une infection pulmonaire par des spores de *B. anthracis*.

Résultats

Objectifs

Une des énigmes de l'infection pulmonaire par *B. anthracis* concerne les mécanismes exacts menant à la forme clinique sévère *via* les voies respiratoires, et plus particulièrement le mécanisme par lequel des spores immobiles sont capturées dans l'alvéole et transportées jusqu'aux ganglions lymphatiques dans les phases précoces de l'infection et sans lésions pulmonaires apparentes.

Le but de mon travail de thèse est de mieux connaître la physiopathologie de l'infection par le bacille du charbon dans un modèle murin et tout particulièrement de décrire les mécanismes primordiaux d'interaction entre le pathogène et l'hôte dans la forme pulmonaire de la maladie ainsi que le rôle précis joué par les DCpulm lors des phases précoces de l'infection.

Au début de ce travail de thèse, la majorité des données existantes sur la pénétration du pathogène lors de l'infection reposait sur des études restreintes aux MA. Les études menées *in vitro* sur les effets des toxines sur des DC spléniques chez la souris (Agrawal *et al.*, 2003) ainsi que d'autres travaux menés au sein du laboratoire sur des DCMO (Tournier *et al.*, 2005) nous ont amené à suspecter le rôle majeur que pouvaient jouer les DCpulm au cours de l'infection.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les phagocytes pulmonaires (DCpulm et MΦpulm) *ex vivo* dans un modèle murin. Ainsi, nous avons étudié les effets des toxines de *B. anthracis* après infection des phagocytes pulmonaires *in vitro* avec des spores de *B. anthracis* acapsulées sécrétant les deux ou une seule des deux toxines ou encore avec une souche acapsulée et atoxinogène. Cette étude nous a permis d'évaluer la sensibilité des DCpulm pour chacune des deux toxines sécrétées au cours de l'infection.

Dans un second temps, après analyse des résultats obtenus *in vitro*, nous avons étudié le rôle joué par les DCpulm dans les mécanismes de propagation du pathogène lors de l'infection. Pour cela, nous avons développé une stratégie *in vivo* d'infection par voie i.n. avec une souche acapsulée et toxinogène. Nous avons examiné les phases précoces de l'infection

au niveau des différents compartiments pulmonaires (LBA et parenchyme pulmonaire) et au niveau des ganglions lymphatiques thoraciques.

Ces deux études ont permis de mieux comprendre le rôle des DCpulm mais aussi celui des MΦpulm dans la physiopathologie du charbon d'inhalation et les résultats font l'objet de deux articles présentés dans ce manuscrit.

Pour plus de cohérence scientifique, nous ne présenterons pas les deux articles selon la chronologie de réalisation du travail, mais nous aborderons dans un premier temps le travail *in vivo* qui se rapporte à la compréhension des étapes les plus précoces de l'infection, puis dans un deuxième temps nous présenterons le travail *in vitro* sur l'étude de l'effet des toxines qui correspond à un stade plus tardif de l'infection.

Résultats

Article I :

Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through pulmonary route.

Aurélie Cleret, Anne Quesnel-Hellmann, Alexandra Vallon-Eberhard, Bernard Verrier, Steffen Jung, Dominique Vidal, Jacques Mathieu, Jean-Nicolas Tournier.
(Article en cours de soumission)

Article II :

Resident CD11c^{+} lung dendritic cells are impaired by anthrax toxins after spore infection.

Aurélie Cleret, Anne Quesnel-Hellmann, Jacques Mathieu, Dominique Vidal, Jean-Nicolas Tournier
The Journal of Infectious Diseases, 2006 ; 194: 86-94.

1. *Caractérisation des sous-populations de phagocytes du tissu pulmonaire (Article II)*

La première étape de mon travail de thèse fut la caractérisation des différentes sous-populations cellulaires présentes au sein du tissu pulmonaire, et plus particulièrement la caractérisation des phagocytes pulmonaires. C'est au cours de l'étude *ex vivo* et en se basant sur la littérature (Lagranderie *et al.*, 2003 ; Vermaelen et Pauwels, 2004) que celle-ci a été réalisée.

Trois sous-populations cellulaires ont été obtenues au niveau des poumons après digestion et sélectionnées en fonction de l'expression des marqueurs CD11c/CD11b : (i) une population $CD11c^{fort}/CD11b^{faible}$ (MΦpulm) ; (ii) une population $CD11c^{intermédiare\ (int)}/CD11b^{int}$ (DCpulm myéloïdes) ; et (iii) une population $CD11c^{faible}/CD11b^{fort}$ (monocytes). Les MΦpulm sont des cellules présentant une forte autofluorescence en comparaison aux DCpulm qui autofluorescent peu. De plus, les DCpulm expriment un taux élevé de molécules du CMH II tandis que les MΦpulm ne l'expriment pas. Après caractérisation de ces différentes sous-populations cellulaires du parenchyme pulmonaire, nous avons analysé le rôle de chacune d'elles au cours des phases précoces de l'infection *in vivo*.

Nous avons également isolé les phagocytes pulmonaires exprimant le marqueur CD11c à l'aide de billes magnétiques. Après purification, nous avons obtenu une suspension cellulaire comprenant environ 70% de MI et 10% de DCpulm myéloïdes.

2. *Étude de la propagation des spores de* B. anthracis *lors des phases précoces d'une infection par inhalation (Article I)*

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux modèles murins complémentaires afin de déterminer le rôle respectif des MA et des DCpulm dans la migration des spores jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques.

2.1. Cinétiques d'infection des populations cellulaires des différents compartiments pulmonaires aux temps précoces de l'infection

La première barrière de défense cellulaire rencontrée par les spores dans l'alvéole est représentée par les MA. Ainsi, dès 10 minutes, nous montrons que plus de 50% de la population des MA a déjà phagocyté les spores ayant atteint les espaces alvéolaires, puis le taux de MA infectés ne varie plus au cours de l'infection.

L'analyse du tissu pulmonaire montre que des spores sont phagocytées par les macrophages pulmonaires et les DCpulm 30 minutes après infection. La présence de DCpulm infectées dès 30 min dans le parenchyme pulmonaire, associée à l'absence des DCpulm dans les LBA, suggère l'existence de mécanismes de capture des spores dans les alvéoles par les DCpulm à travers la barrière épithéliale alvéolaire.

Les monocytes présents dans l'interstitium pulmonaire aux temps précoces ne phagocytent pas de spores. Les DCpulm et les macrophages pulmonaires constituent donc les seules cellules infectées du parenchyme pulmonaire, ce qui démontre l'importance des phagocytes dans la clairance des pathogènes présents dans l'espace alvéolaire.

Un fort recrutement de DCpulm et de monocytes est ensuite observé dans les alvéoles (6 heures après infection). Les DCpulm ainsi recrutées phagocytent très efficacement les spores présentes dans les alvéoles comparativement aux MA ou aux monocytes.

2.2. Contacts DCpulm – pathogène au cours des phases précoces de l'infection

Dès 10 minutes, des contacts proches sont observés dans les alvéoles pulmonaires entre les DCpulm et les spores sans phagocytose. Ce n'est qu'à 30 minutes que des colocalisations DCpulm – spores sont observées, correspondant à la phagocytose active des spores par les DCpulm.

2.3. Cinétique de diffusion du pathogène jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques

Plusieurs travaux ont mis en évidence la capacité de migration des DCpulm jusqu'aux ganglions lymphatiques (Vermaelen *et al.*, 2001 ; Jakubzick *et al.*, 2006). Ici, nous montrons que, suite à une infection par inhalation, des spores sont transportées dès 30 minutes dans les ganglions lymphatiques thoraciques, et qu'elles sont associées aux DCpulm. La proportion de cellules infectées observées dans les ganglions ne cesse d'augmenter jusqu'à 72 heures après infection.

Le flux continu de DCpulm depuis les poumons jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques est associé à une déplétion du tissu pulmonaire en DCpulm 4 heures après infection.

Nous montrons ici que les DCpulm jouent donc le rôle de « cheval de Troie » pour les spores de *B. anthracis* et transportent les spores de la muqueuse pulmonaire jusqu'aux ganglions lymphatiques très rapidement après infection.

3. *Etude des effets des toxines sécrétées par* B. anthracis *sur les DCpulm isolées* ex vivo *(Article II)*

Nous avons étudié le rôle de LT et ET dans les mécanismes physiopathologiques du charbon d'inhalation en analysant les fonctions des DCpulm après infection *in vitro* avec des souches de *B. anthracis* sécrétant LT, ET ou les deux toxines ou avec une souche atoxinogène.

Les DCpulm étant le « véhicule » des spores de *B. anthracis*, l'étude des effets des toxines sur les DCpulm permet de connaître le rôle des toxines seules, ou associées dans les phases plus tardives de l'infection.

Dans un premier temps, l'utilisation d'un Ac anti-BclA couplé à un fluorochrome nous a permis de montrer que les DCpulm phagocytent plus efficacement les spores de *B. anthracis* que les macrophages pulmonaires après infection *in vitro*.

3.1 Effets des toxines sur la maturation des DCpulm

Après infection avec une souche atoxinogène, une petite sous-population de DCpulm est activée. Cette activation est caractérisée par la co-expression des molécules du CMH II et CD86. LT inhibe la maturation de cette sous-population de DCpulm, de manière dose-dépendante. A l'inverse, ET ne semble pas avoir d'effet majeur sur la maturation des DCpulm *in vitro*.

Des résultats similaires ont été obtenus après intoxination des phagocytes pulmonaires avec les toxines purifiées, ce qui démontre l'effet spécifique des toxines sur la maturation des DCpulm.

Nous avons ensuite montré que LT avait un effet spécifique sur la maturation des DCpulm et non sur celle des DCMO. Ces résultats démontrent l'importance du choix de notre modèle cellulaire d'étude.

3.2 Effets des toxines sur la sécrétion de cytokines par les phagocytes pulmonaires

La sécrétion de cytokines par les phagocytes pulmonaires après infection est essentielle à la mise en place d'une réponse immune innée et/ou spécifique.

Le dosage des cytokines (TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12p70 et IFN-γ) et de la chimiokine CCL-2 est réalisé 18 heures après infection. Les phagocytes pulmonaires $CD11c^+$ infectés avec la souche atoxinogène RP42 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-6) et une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10. ET et LT ont chacune des effets spécifiques sur les CPA pulmonaires en terme de sécrétion de cytokines.

LT inhibe la sécrétion d'IL-6, d'IL-10 et de TNF-α par les phagocytes pulmonaires tandis que ET inhibe la sécrétion de TNF-α mais n'affecte pas celle d'IL-10 et augmente la production d'IL-6. Les mêmes résultats sont obtenus après incubation des cellules avec les toxines purifiées.

Cette étude *ex vivo* a mis en évidence les effets des toxines sur certaines fonctions des DCpulm et plus particulièrement les effets spécifiques de chacune des toxines sur la maturation des DCpulm et sur la sécrétion de cytokines par les phagocytes pulmonaires. D'après nos résultats, LT semble avoir un rôle prédominant *ex vivo*.

Article I

Title

Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. [1]

Running title:

Lung dendritic cells rapidly transport anthrax spores.

Authors

Aurélie Cleret,[*] Anne Quesnel-Hellmann,[*] Alexandra Vallon-Eberhard,†‡ Bernard Verrier,† Steffen Jung,‡ [2] Dominique Vidal,[*] Jacques Mathieu,[*] Jean-Nicolas Tournier[*3]

* Unité interactions hôte-pathogène, Département de Biologie des Agents Transmissibles, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France;

† CNRS, Université Lyon 1, UMR5086, IBCP, IFR128, Biosciences Gerland, Lyon, France;

‡ Department of Immunology; The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

Keywords: rodent, dendritic cells, bacterial, lung, cell trafficking

Abstract

Inhalational anthrax is a life-threatening infectious disease of considerable concern, especially because anthrax is an emerging bioterrorism agent. The exact mechanisms leading to a severe clinical form through the inhalational route are still unclear, particularly how immobile spores are captured in the alveoli and transported to the lymph nodes in the early steps of infection. We address the respective roles of alveolar macrophages (AM) and lung dendritic cells (LDC) in spore migration. We demonstrate that AMs are the first cells to phagocytose alveolar spores within 10 minutes. However, interstitial LDCs capture spores in the alveoli within 30 min without trans-migrating across the epithelial barrier suggesting an indirect mechanism of alveolus sampling. We show that interstitial LDCs constitute the cell population that transports spores into the thoracic lymph nodes (TLN) from within 30 min to 72 hrs after intranasal infection. Our results demonstrate that LDCs are central to spore transport immediately after infection. The rapid kinetics of pathogen transport may contribute to the clinical features of inhalational anthrax.

Introduction

Bacillus anthracis, the causal agent of anthrax, is a Gram-positive, spore-forming bacterium responsible for an anthropozoonosis that can accidentally infect humans (1). Anthrax has become a major concern after its use as a bioweapon in the terrorist attacks of fall 2001. The bacilli produce two major virulence factors: (i) a poly-γ-D-glutamate capsule (2) and (ii) two toxins known as lethal toxin (LT)[4] and edema toxin (ET) (3). *B. anthracis* is responsible for two very different clinical diseases: the cutaneous form, which is relatively benign, easily identified and treated with antibiotics, and the inhalational form, which is extremely severe, fulminating and difficult to diagnose (4).

The exact mechanisms leading to the severe clinical form remain unclear, but the contrast between skin and pulmonary infections may be explained by the architectural and functional singularities of the lung tissue (5). The lung architecture is devoted to respiratory exchanges through the alveolocapillary barrier. However, the mucosal surface of the pulmonary tract is exposed to multiple pathogens and the thin layer of exchange must be protected from damage by inflammatory processes. Alveolar macrophages (AMs) that participate in the elimination of particles and pathogens exhibit numerous anti-inflammatory properties (6, 7). Furthermore, two main subsets of lung dendritic cells (LDCs) have been described in the lung, participating in the control of the immune response: myeloid LDCs and plasmacytoid LDCs (reviewed in (8-10)). Myeloid LDCs play the major role in antigen presentation in the lung (11, 12), whereas plasmacytoid LDCs are efficient in virus clearance and in the resolution of inflammation (13-15). Although LDCs have been implicated in trafficking between the lung and thoracic lymph nodes (TLNs) in several models of allergen and particle inhalation (16, 17), the role of LDCs in inhalational anthrax is still unclear.

AMs from broncho-alveolar lavages (BALs) can phagocytose spores in several animal models of inhalational anthrax (18-20). Previous animal infection experiments reported that

numerous infected phagocytes were found in TLNs in the few hours following infection, inducing a lymphadenitis (21-24). Thus, the TLNs are a main target for the proliferation and spread of the pathogen throughout the organism, leading ultimately to death. Clinical data and gross necropsy from fall 2001 cohorts have confirmed the same kinetics of infection in humans (25). Pulmonary anthrax does not correspond to a true pulmonary disease, and it can spread in the absence of lung injury. This signifies that *B. anthracis* spores could "hijack" phagocytic cells encountered in the lungs, inhibiting the production of inflammatory signals and forcing them to migrate to the TLNs. In accordance with that prediction, we and others have shown in several models of macrophages and DCs *in vitro* that toxins secreted early after germination extinguish proinflammatory signals (26-30). The nature of the lung phagocytic cells that migrate has not yet been precisely defined, although AMs were proposed to play the role of the 'Trojan horse' (20). LDCs continually sample the contents of the alveoli for particulate antigens, and unlike the AM population carry them to the TLNs (17), and we have already shown that LDCs phagocytose anthrax spores more efficiently than AMs (31). We hypothesized that LDCs may represent a better target for anthrax spores. We examined the interactions between anthrax spores and the different lung phagocytic cell populations by using intranasal infection, which mimics an aerosol, and by following up the infection at the cellular level in mouse models.

We show that AMs immediately capture anthrax spores in the alveoli, whereas interstitial LDCs capture them within 30 min without trans-migrating across the epithelial barrier. These results suggest an indirect mechanism of alveolar spore sampling by trans-epithelial extensions. Then, LDCs rapidly carry the spores to the TLNs within 30 minutes, and this transport increases until 6 hrs after infection. Monocytes and LDCs are recruited 6 hours later in the alveoli and constitute a new pool of alveolar cells. The timing of infection observed here is very rapid and is consistent with the fulminating form of inhalational anthrax.

Materials and methods

Animals

C57BL/6 ($H2^b$) mice (CERJ) were housed in clean standard conditions in our animal care facility (CRSSA), and $CX_3CR1^{gfp/+}$ mice on a C57BL/6 genetic background (32) were maintained under specific pathogen-free conditions at the PBES (Ecole Normale Supérieure de Lyon). The local ethics committees approved our animal experiments according to international guidelines.

B. anthracis ***strains and intranasal infection***

B. anthracis Sterne-p6gfp strain was provided by F. Tonello (University of Padova, Italy). The Sterne-p6gfp was constructed by electroporation of plasmid pAFp6gfp (gift from T. Hoover, USAMRIID, Frederick, MD) into the Sterne strain ($pXO1^+$ / $pXO2^-$) (33).

B. anthracis Sterne 7702 strain ($pXO1^+$ / $pXO2^-$) was provided by M. Mock (Institut Pasteur, Paris, France). The spores were chemically labeled with Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Molecular Probes) as follows: 3 x 10^9 CFU of the Sterne strain of *B. anthracis* were stained with the reactive dye in 10 ml H_2O - 0.1 M sodium bicarbonate for 1 hour protected from light. Spores were washed five times in H_2O - 0.1 M sodium bicarbonate. The spores were maintained in H_2O at 4 °C to avoid germination (34).

Spores were diluted to a final concentration of 2 x 10^9 CFU/ml and heat activated for 10 min at 70°C. Mice were anesthetized and 50 µl of spores were administered intranasally (i.n.) at 10^8 CFU/mouse.

Analysis of infection in BALs, total lung cells and TLNs

C57BL/6 mice were killed 10 min, 30 min, 1 h, 6 h, 24 h and 72 h after i.n. infection by the Sterne-p6gfp strain. BALs, lungs and draining TLNs were collected at each time point.

BAL cells and total lung cells were obtained as previously described (31). Briefly, the lungs were washed three times with 1 ml ice-cold PBS - 2 mM EDTA to collect BAL cells. Single-cell suspensions of lung cells were isolated by enzymatic digestion of lung tissue by collagenase (Worthington Biochemical Corp.) and DNAse (Sigma-Aldrich).

Two mice were killed at each time point for measuring the bacterial load. Lungs were removed without previous BALs, and Potter-dissociated in 1 ml ice-cold H_2O. Serial dilutions were plated on TS agar – kanamycin (Sigma-Aldrich) directly or after heating at 65 °C for 30 min to kill any vegetative bacteria.

Cells were incubated with FcR blocking antibody (anti-mouse CD16/CD32 antibody, clone 2.4G2, BD Biosciences) to reduce non-specific binding. Cells were incubated for 30 min with anti-CD11b-PE (clone M1/70), anti-I-A/I-E-PE (clone M5/114.15.2), anti-CD11c-biotin (clone HL3) or corresponding isotypes (all from BD Biosciences) at 4°C. Streptavidin-APC was used after incubation with biotinylated mAb. Cells were then fixed with PBS, 1% BSA, 0.1% azide, 4% paraformaldehyde. Cell acquisition was carried out on a FC500 (Beckman Coulter) and the data were analyzed with CXP software® (Beckman Coulter).

At 24 hours, BAL cells were stained for CD11c and CD11b and separated by fluorescence-activated cell sorting on a FACS-Vantage (BD Biosciences). Cytocentrifuge preparations of the different gates were colored with Giemsa. Cytospins were observed on an axioimager Z1 microscope (Zeiss).

For confocal microscopy analysis, C57BL/6 BAL cells were collected 1 hr after i.n. infection and stained with CD11b-unlabeled (clone M1/70, Beckman Coulter) and CD11c-biotinylated (clone HL3, BD Biosciences) Abs for 30 min at 4°C. Cells were then washed and

incubated with rabbit anti-rat IgG-Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories) and streptavidin-Cy5 (Beckman Coulter) for 30 min 4°C. Cells were washed twice, and fixed in PBS, 1% BSA, 0.1% azide, 4% paraformaldehyde. Cytocentrifuge preparations were performed, fixed and mounted with Vectashield DAPI-medium (Dako). Cells were observed on a confocal axioplan LSM510 microscope (Zeiss).

Analysis of spore-LDC contacts and transports

BAL cells and total lung cells of non-infected $CX_3CR1^{+/gfp}$ mice were collected as described above and analyzed by flow cytometry.

$CX_3CR1^{+/gfp}$ mice infected by Alexa-647 Sterne spores were serially killed at 10 min, 30 min, 1 h, 4 h, and 24 h after infection for analysis of the early steps of infection. Mice were injected intra-tracheally with 1% agarose.

Lungs from $CX_3CR1^{+/gfp}$ mice were cut into 1 mm sections and mounted on slides for microscopic examination. TLNs were also removed and mounted on slides before analysis.

All observations were performed on a confocal axioplan LSM510 microscope (Zeiss).

Results

To examine the kinetics of anthrax infection, we inoculated C57BL/6 mice i.n. with Sterne-p6gfp spores. We dissected cell-pathogen interactions by examining different compartments of infected organs: alveolar spaces by collecting BALs, lung parenchyma by analyzing total lung cells and draining TLNs.

Kinetics of BAL infection

We discriminated between different cells by using the CD11c/CD11b expression pattern as previously described (12, 17, 31, 35). Inhaled spores first encounter resident cells of the alveoli; therefore we analyzed BALs which are mostly composed of AMs (R1, $CD11c^{high}/CD11b^{-}$ ~90%) in uninfected controls (Fig. 1*A*, non-infected panel). As early as 10 min after infection with Sterne-p6gfp spores, about 65% of AMs were positive for gfp, suggesting that they engulfed spores very rapidly. Subsequent confocal analysis of BAL cells confirmed that gfp-spores were inside the cells (Fig. 1*B*). The percentage of AMs phagocytosing Sterne-p6gfp spores was relatively stable for the first 24 hours and progressively decreased thereafter (Fig. 1*C*). In the six hours following instillation, two cell populations were recruited *de novo* in the alveoli: a population of $CD11b^{+}/CD11c^{-}$ cells (R3) which represented about 40% of the total cells, and a cell population expressing intermediate levels of CD11b and CD11c markers (R2), representing about 4% of the total cells and increasing to 6% in the next 24 hours. With respect to their appearance after Giemsa staining, cells in R2 were clearly LDCs, whereas those in R3 corresponded to a monocyte population (Fig.1*D*). In accordance with our previous results (31), 80% of the LDCs recruited in the alveoli were Sterne-p6gfp-positive (mean fluorescence intensity (MFI) of 20.5) at 6 hours, whereas AMs (about 50% of the total cell population with an MFI of 16.0) and monocytes (38% of the total cell population with an MFI of 6.9) were less positive for Sterne-p6gfp

spores. At 24 and 72 hours, monocytes still represented a large proportion of BAL cells (36% and 30% at each time point) with lower phagocytic capabilities (MFI of 6.0 at 24 hours, and MFI of 4.4 at 72 hours). In contrast, the population of LDCs increased to represent about 20% of total cells at 72 hours post-infection. However, these LDCs were less efficient at phagocytosing Sterne-p6gfp spores (about 55% and 30% of gfp^+ cells with MFI of 19.2 and 4.3 for each time point), or spores were less available for LDC phagocytosis.

Another, less well-characterized $CD11c^+/CD11b^{low}$ population (R') was observed. This population represented about 20% of total BAL cells and increased up to 30% at 72 hours after infection. These cells had an intermediate phagocytosis capacity (MFI of 14.3 at 6 hrs. after infection, and MFI of 10.2 at 24 hours after infection) compared to LDCs. This cell population was very similar to AMs, and it appeared while the R1 population percentage decreased, so it was probably an activated AM population. Cell sorting of R' followed by Giemsa staining clearly confirmed that this population corresponded to an AM population (Fig.1*D*).

Kinetics of lung cell infection

Next, we analyzed the presence and phagocytosis ability of several lung cell populations, to differentiate which lung population captured spores.

As previously shown, we identified three main populations corresponding to macrophages (R1, $CD11c^{high}/CD11b^-$ including interstitial macrophages (IM) and AMs still present in the alveoli after lavages), LDCs (R2, $CD11c^{int}/CD11b^{int}$) and monocytes (R3, $CD11c^-/CD11b^{high}$) (Fig. 2*A*). Ten minutes after infection we found a Sterne-p6gfp-positive population representing about 10% of the macrophage population (Fig. 2*B*). This might have been AMs not collected by lavages, suggesting that AMs were the first sentinels to encounter spores in the earliest step of infection. LDCs (12% of gfp-positive cells) captured spores secondarily at

30 min, whereas monocytes did not. Notably, LDCs were absent from the alveoli at this early time of infection (Fig. 1*A*, panel 30 min-Total cells). The percentage of gfp-positive macrophages and LDCs did not change significantly over time, and LDCs were more efficient than macrophages at phagocytosing spores, as observed in BALs (Fig. 2*C*). The percentage of the macrophage population did not change following infection whereas monocytes were recruited 30 min after infection and then decreased over time. Recruitment of LDCs was transiently observed 24 hours after infection.

We did not observe any germination in the lung, in accordance with another report (Fig. 2*D*) (34).

Kinetics of spore transport to the TLNs

We gated our analysis of TLN populations on CD11c-positive cells representing a population strongly expressing MHC II (Fig. 3*A*), previously described as TLN DCs (11). We analyzed the percentage of Sterne-p6gfp-positive cells gated on $CD11c^+$ cells reaching the TLNs after i.n. infection to assess DCs spore carriage to regional lymphoid tissue (Fig. 3*B*). We observed a significant increase of gfp-positive cells from 27% at 30 min to a 75% peak 6 hrs after infection and a progressive decrease to 46% at 72 hours (Fig. 3*B*). The MFI of Sterne-p6gfp-positive cells gated on $CD11c^+$ cells increased with similar kinetics up to 6 hrs and decreased thereafter to 72 hrs (8.9 and 6.0 at 6 and 72 hrs, respectively).

Analysis of spore-LDC contacts

To address the role of LDCs in spore transport from alveoli to TLNs through the intact alveolocapillary barrier, we used transgenic $CX_3CR1^{+/gfp}$ mice that specifically expressed gfp in DCs. Mice were infected with Alexa-647-labeled Sterne spores (32). First, we ascertained that gfp was specifically expressed in LDCs but not in BAL AMs (Fig. 4*A*) and total lung

cells (Fig. 4*B*). As previously shown in the digestive tract (36, 37) and in the lung (38), gfp was specifically expressed in CX_3CR1-LDCs (gate R2, $CD11c^{int}/CD11b^{int}$) present in pulmonary parenchyma, but not in AMs (gate R1, $CD11c^{+}/CD11b^{-}$) from BAL fluids. Confocal analysis of lungs and TLNs from uninfected $CX_3CR1^{+/gfp}$ mice showed a thin web of green fluorescent cells harboring long dendrites in alveolar walls and TLNs (Fig. 4*C*). Ten min after i.n. infection, some Alexa-647-labeled Sterne spore-DC contacts were observed in the lung, but LDC-spore co-localizations were more evident at 30 min and 1 h and spores were principally observed in dendrite extensions (Fig. 5*A*). At 30 min, several LDCs colocalized with Alexa-647-labeled Sterne spores in the TLNs, demonstrating rapid kinetics of sampling and transport that were more pronounced after 1 h. As compared to our flow cytometry analysis, these results confirmed that LDCs efficiently transport anthrax spores to the TLNs rapidly after infection. The subsequent triggering of massive LDC migration by the infection was confirmed by the diminution of LDC web density in the lung after 4 h, associated with spores colocalizing in the TLNs. Lung analysis at 24 hours showed a recolonization by LDCs (data not shown). In accordance with our previous model, TLN analysis showed DCs capturing Alexa-647-labeled Sterne spores in TLNs at 30 min, and increasing after 1 to 4 hours (Fig. 5*B*).

Discussion

In this study, we demonstrate that LDCs constitute the main cellular population responsible for the early spread of anthrax spores. AMs had previously been suspected to play the role of the 'Trojan horse'. We show here that although AMs are the first sentinels as they phagocytose most spores in the first 10 min in the alveoli, they are unable to transport them. In contrast, after a slight delay of 30 min, LDCs capture spores and then carry them rapidly to the TLNs (between 30 min and 6 hours after infection). During the next 72 hours, a second wave of cells is recruited in the alveoli, consisting of a large population of monocytes and a minority of LDCs.

These data present an original scenario for *B. anthracis* entry by the pulmonary route. AMs are the first scavengers of spores, while LDCs capture spores from the outside of the alveoli within the first half hour of infection. The transalveolo-capillary crossing constitutes the first step of pathogen diffusion, and confocal microscopy data showed spores precisely inside LDC dendrites 30 min after infection, although they were not observed in the BALs. LDCs can thus be proposed as the major effectors of the transalveolo-capillary crossing. AMs may first encounter aerosol anthrax spores, may phagocytose them, and as recently shown, may recognize sporal pathogen-associated molecular pattern (PAMP) through a MyD88-dependent mechanism (39). The activation of AMs may lead to the release of chemokine signaling for LDC recruitment, activation and spore uptake by a mechanism yet to be determined. A rat model recently showed that LDCs are able to send cell extensions between epithelial cells in the tracheal lumen to capture Ags, with an acceleration of Ag sampling within 30 min after bacterial stimulus (40). Another report on mouse lungs suggests that a subpopulation of LDCs display CD103 (α_E)-β7 integrin, potentially enabling these cells to migrate through the epithelium (41). Our results fit well with the possibility that LDCs may send extensions into the alveoli, since we did not observe any recruitment of LDCs in the

BALs at 30 min, while at the same time 12% of LDCs in the lung were already infected. These LDCs that have phagocytosed spores may have sampled the alveoli through cell extensions without trans-migration, which would have taken a longer time. The signal that triggers LDC rapid sampling is still unknown, but CX_3CL1, the CX_3CR1 receptor ligand, could play a role, as exemplified by pathogen uptake in the gut (36). Moreover, we show in our experiments with $CX_3CR1^{+/gfp}$ mice that CX_3CR1-positive LDCs participate in spore uptake and transport. The mechanisms involved in LDC migration to TLNs are not yet determined. Spores have been shown to trigger the reprogramming of chemokine expression by human DCs, due to a loss of transcription in tissues retaining chemokine receptors (CCR2, CCR5) and due to the induction of lymph node homing receptor CCR7 gene transcription (42). It is likely that the recognition of sporal PAMP by a MyD88-dependent mechanism (39) may also facilitate the reprogramming of chemokine receptors and increase the physiological migration of LDCs towards the draining TLNs. In this early phase of infection, AMs and LDCs may cooperate closely in their respective roles: sampling and transport of Ag for LDCs, and capture and destruction of pathogens for AMs.

After 6 hours of infection, LDCs and monocytes move to the alveoli. These two populations may have been recruited by AM signals, even though it is not clear whether monocytes differentiate into LDCs in the alveoli or whether differentiated LDCs come up directly from interstitial tissues. Furthermore, some spores may have germinated inside the cells *en route* and started to secrete their toxins to impair LDC functions (28, 29, 31).

Although the role of pathogens in the migration of LDCs has previously been reported in several models of viral (43-45) or *Mycobacterium tuberculosis* (46, 47) infection, we describe here for the first time the very rapid kinetics of pathogen migration using LDCs.

We propose that LDCs are the real ‘galloping Trojan horse’ of anthrax spores in inhalational anthrax, since they are able to sample alveoli and to migrate to the TLNs in the

first half hour of infection, unlike AMs, which phagocytose spores without transporting them. In the next 72 hours, LDCs efficiently transport spores, facilitating pathogen diffusion throughout the body.

One of the most striking features of our results is the extreme rapidity of spore transport, starting 30 min after infection, which is very consistent with the fulminating form of inhalational anthrax. This signifies that exposure to an anthrax aerosol must be considered as a profound infection as early as 30 min following exposure, and the patient should be medically treated as soon as possible. These results should be taken into account for medical management after exposure to an anthrax aerosol.

Acknowledgements

We would like to thank Fabienne Simian-Lermé (PLATIM, Lyon) for her excellent assistance in confocal microscopy, Jean-François Mayol (CRSSA, unité de radio-hématologie expérimentale) for cell sorting, and Fiorella Tonello (University of Padova, Italy) for providing the Sterne-p6gfp strain.

References

1. Mock, M., and A. Fouet. 2001. Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55:647-671.
2. Candela, T., and A. Fouet. 2006. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol Microbiol* 60:1091-1098.
3. Collier, R. J., and J. A. Young. 2003. Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:45-70.
4. Dixon, T. C., M. Meselson, J. Guillemin, and P. C. Hanna. 1999. Anthrax. *N Engl J Med* 341:815-826.
5. Tournier, J. N., A. Quesnel-Hellmann, A. Cleret, and D. R. Vidal. 2007. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol* 9:555-565.
6. Takabayshi, K., M. Corr, T. Hayashi, V. Redecke, L. Beck, D. Guiney, D. Sheppard, and E. Raz. 2006. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity* 24:475-487.
7. Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov, and P. W. Noble. 2005. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 11:1173-1179.
8. Hammad, H., and B. N. Lambrecht. 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 118:331-336.
9. de Heer, H. J., H. Hammad, M. Kool, and B. N. Lambrecht. 2005. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol* 17:295-303.
10. Vermaelen, K., and R. Pauwels. 2005. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 172:530-551.
11. Vermaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht, and R. A. Pauwels. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193:51-60.
12. von Garnier, C., L. Filgueira, M. Wikstrom, M. Smith, J. A. Thomas, D. H. Strickland, P. G. Holt, and P. A. Stumbles. 2005. Anatomical Location Determines the Distribution and Function of Dendritic Cells and Other APCs in the Respiratory Tract. *J Immunol* 175:1609-1618.
13. de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200:89-98.
14. Wang, H., N. Peters, and J. Schwarze. 2006. Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 177:6263-6270.
15. Smit, J. J., B. D. Rudd, and N. W. Lukacs. 2006. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J Exp Med* 203:1153-1159.
16. Julia, V., E. M. Hessel, L. Malherbe, N. Glaichenhaus, A. O'Garra, and R. L. Coffman. 2002. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16:271-283.
17. Jakubzick, C., F. Tacke, J. Llodra, N. van Rooijen, and G. J. Randolph. 2006. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 176:3578-3584.

18. Barnes, J. M. 1947. The development of anthrax following the administration of spores by inhalation. *Brit J Exptl Pathol* 28:385-394.
19. Young, G. A., M. R. Zelle, and R. Lincoln. 1946. Respiratory pathogenicity of *Bacillus anthracis* spores. I. Methods of study and observation on pathogenesis. *J Infect Dis* 79:233-246.
20. Guidi-Rontani, C. 2002. The alveolar macrophage: the Trojan horse of Bacillus anthracis. *Trends Microbiol* 10:405-409.
21. Ross, J. M. 1957. The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by respiratory route. *J Path Bact* LXXIII:485-493.
22. Lincoln, R. E., D. R. Hodges, F. Klein, B. G. Mahlandt, W. I. Jones, Jr., B. W. Haines, M. A. Rhian, and J. S. Walker. 1965. Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis* 115:481-494.
23. Albrink, W. S., and R. J. Goodlow. 1959. Experimental inhalation anthrax in the chimpanzee. *Am J Pathol* 35:1055-1065.
24. Henderson, D. W., S. Peacock, and F. C. Belton. 1956. Observations on the prophylaxis of experimental pulmonary anthrax in the monkey. *J Hyg (Lond)* 54:28-36.
25. Guarner, J., J. A. Jernigan, W. J. Shieh, K. Tatti, L. M. Flannagan, D. S. Stephens, T. Popovic, D. A. Ashford, B. A. Perkins, and S. R. Zaki. 2003. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am J Pathol* 163:701-709.
26. Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G. Vitale, M. Mock, and C. Montecucco. 1999. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFNgamma-induced release of NO and TNFalpha. *FEBS Lett* 462:199-204.
27. Erwin, J. L., L. M. DaSilva, S. Bavari, S. F. Little, A. M. Friedlander, and T. C. Chanh. 2001. Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to Bacillus anthracis lethal toxin. *Infect Immun* 69:1175-1177.
28. Agrawal, A., J. Lingappa, S. H. Leppla, S. Agrawal, A. Jabbar, C. Quinn, and B. Pulendran. 2003. Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* 424:329-334.
29. Tournier, J. N., A. Quesnel-Hellmann, J. Mathieu, C. Montecucco, W. J. Tang, M. Mock, D. R. Vidal, and P. L. Goossens. 2005. Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* 174:4934-4941.
30. Alileche, A., E. R. Serfass, S. M. Muehlbauer, S. A. Porcelli, and J. Brojatsch. 2005. Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. *PLoS Pathog* 1:e19.
31. Cleret, A., A. Quesnel-Hellmann, J. Mathieu, D. Vidal, and J. N. Tournier. 2006. Resident CD11c+ Lung Cells Are Impaired by Anthrax Toxins after Spore Infection. *J Infect Dis* 194:86-94.
32. Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M. J. Sunshine, G. W. Kreutzberg, A. Sher, and D. R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.
33. Ruthel, G., W. J. Ribot, S. Bavari, and T. A. Hoover. 2004. Time-lapse confocal imaging of development of Bacillus anthracis in macrophages. *J Infect Dis* 189:1313-1316.
34. Cote, C. K., N. Van Rooijen, and S. L. Welkos. 2006. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to Bacillus anthracis spores in a mouse model of infection. *Infect Immun* 74:469-480.

35. Vermaelen, K., and R. Pauwels. 2004. Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. *Cytometry A* 61:170-177.
36. Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H. C. Reinecker. 2005. CX_3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.
37. Vallon-Eberhard, A., L. Landsman, N. Yogev, B. Verrier, and S. Jung. 2006. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J Immunol* 176:2465-2469.
38. Landsman, L., C. Varol, and S. Jung. 2007. Distinct differenciation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178:2000-2007.
39. Glomski, I. J., J. H. Fritz, S. J. Keppler, V. Balloy, M. Chignard, M. Mock, and P. L. Goossens. 2007. Murine splenocytes produce inflammatory cytokines in a MyD88-dependent response to Bacillus anthracis spores. *Cell Microbiol* 9:502-513.
40. Jahnsen, F. L., D. H. Strickland, J. A. Thomas, I. T. Tobagus, S. Napoli, G. R. Zosky, D. J. Turner, P. D. Sly, P. A. Stumbles, and P. G. Holt. 2006. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177:5861-5867.
41. Sung, S. S., S. M. Fu, C. E. Rose, Jr., F. Gaskin, S. T. Ju, and S. R. Beaty. 2006. A Major Lung CD103 ({alpha}E)-beta7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins. *J Immunol* 176:2161-2172.
42. Brittingham, K. C., G. Ruthel, R. G. Panchal, C. L. Fuller, W. J. Ribot, T. A. Hoover, H. A. Young, A. O. Anderson, and S. Bavari. 2005. Dendritic cells endocytose Bacillus anthracis spores: implications for anthrax pathogenesis. *J Immunol* 174:5545-5552.
43. Thiele, A. T., T. L. Sumpter, J. A. Walker, Q. Xu, C. H. Chang, R. L. Bacallao, R. Kher, and D. S. Wilkes. 2006. Pulmonary immunity to viral infection: adenovirus infection of lung dendritic cells renders T cells nonresponsive to interleukin-2. *J Virol* 80:1826-1836.
44. Legge, K. L., and T. J. Braciale. 2003. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity* 18:265-277.
45. Brimnes, M. K., L. Bonifaz, R. M. Steinman, and T. M. Moran. 2003. Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *J Exp Med* 198:133-144.
46. Khader, S. A., S. Partida-Sanchez, G. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, S. Swain, J. E. Pearl, N. Ghilardi, F. J. Desauvage, F. E. Lund, and A. M. Cooper. 2006. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 203:1805-1815.
47. Humphreys, I. R., G. R. Stewart, D. J. Turner, J. Patel, D. Karamanou, R. J. Snelgrove, and D. B. Young. 2006. A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infect* 8:1339-1346.

Footnote page

[1] This work was supported by a grant from the Délégation Générale pour l'Armement (CO 010808) and by the Service de Santé des Armées (135OP3B LFR EMA).

[2] S.J. is the incumbent of the Pauline Recanati Career Development Chair and a Scholar of the Benoziyo Center for Molecular Medicine.

[3] Address for correspondence and reprint requests: Dr. J.-N. Tournier, Unité interactions hôte-pathogène, Département de Biologie des Agents Transmissibles, CRSSA, 24 avenue des maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France, phone: +33 (0)476 636 848, fax: +33 (0)476 636 917, jntournier@crssa.net

[4] Abbreviations used in this paper: AM, alveolar macrophage; BAL, broncho-alveolar lavage; ET, edema toxin; LDC, lung dendritic cell; LT, lethal toxin; MFI, mean fluorescence intensity; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; TLN, thoracic lymph node.

Figure captions

Figure 1: Kinetics of cell infection in bronchio-alveolar lavages (BAL).

(A) BAL cells were harvested at early time points after infection and stained for CD11c and CD11b expression. The percentage of cells in each gate is shown ("total cells" panels). The phagocytosis of gfp-spores was analyzed by the level of gfp fluorescence in cells gated on R1 (AM gate). The percentage of gfp-positive cells and the mean fluorescence intensity of the cell population are shown. Data represent one mouse out of a group of three. Each experiment was independently reproduced three times with similar results.

(B) Confocal analysis of BAL cells for gfp/CD11b/CD11c expression 1 hour after infection.

(C) BAL cells were harvested at late time points after infection and stained as in (A). The percentage of cells in each gate is shown ("total cells" panels). The phagocytosis of gfp-spores was analyzed by the level of gfp fluorescence in cells gated on R1 and R’ (AM gates), R2 (LDC gate) and R3 (monocyte gate). The percentage of gfp-positive cells and the mean fluorescence intensity of the cell population are shown. Data show one mouse out of a group of three. Each experiment was independently reproduced three times with similar results.

(D) Cells in gates R1, R’, R2 and R3 were sorted and spotted onto slides for Giemsa staining.

Figure 2: Kinetics of lung cell infection.

(A) Total lung cells were harvested from non-infected mice and stained for CD11c and CD11b expression. The percentage of cells in each gate is shown. Data shown represent more than 6 experiments with similar results.

(B) Total lung cells were harvested at various times after infection with gfp-spores and were stained for CD11c and CD11b expression. Each histogram represents the percentage of cells in each gate (white bar) and the percentage of gfp-positive cells for each population (dashed bar) for each gate (R1 (AM gate), R2 (LDC gate) and R3 (monocyte gate)). Data show cell percentages (+/- SD) representative of three independent experiments with similar results.

(C) The mean fluorescence intensity (MFI) is represented at each time point for each population. Data show the cell percentages (+/- SD) representative of three independent experiments.

(D) Colony forming units (CFU) of total lungs after heat treatment at 65 °C for 30 min (open bars) or without heat treatment (black bars) at each time point. Data show CFU (+/- SD) representative of three independent experiments with similar results.

Figure 3: Kinetics of spore transport to the draining thoracic lymph nodes (TLNs).

(A) TLNs were harvested from non-infected mice and stained for CD11c and MHC II expression. Cells were gated on CD11c/FSC parameter and analyzed on MHC II expression and FL1 fluorescence.

(B) TLNs were harvested at various times after infection and stained for CD11c. Panels show the gfp fluorescence of cells gated on CD11c expression. Values at the top right of each panel are the percentage of gfp-positive cells, and the values in brackets

represent the MFI. Data show one mouse out of a group of three. Each experiment was reproduced independently three times with similar results.

Figure 4: Characterization of lung dendritic cells (LDCs) in $CX_3CR1^{+/gfp}$ mice.

(A) Bronchio-alveolar lavages were stained for CD11b and CD11c markers (left panel) and analyzed for gfp expression (right panel). Values at the top right of each panel are the percentages of gfp-positive cells.

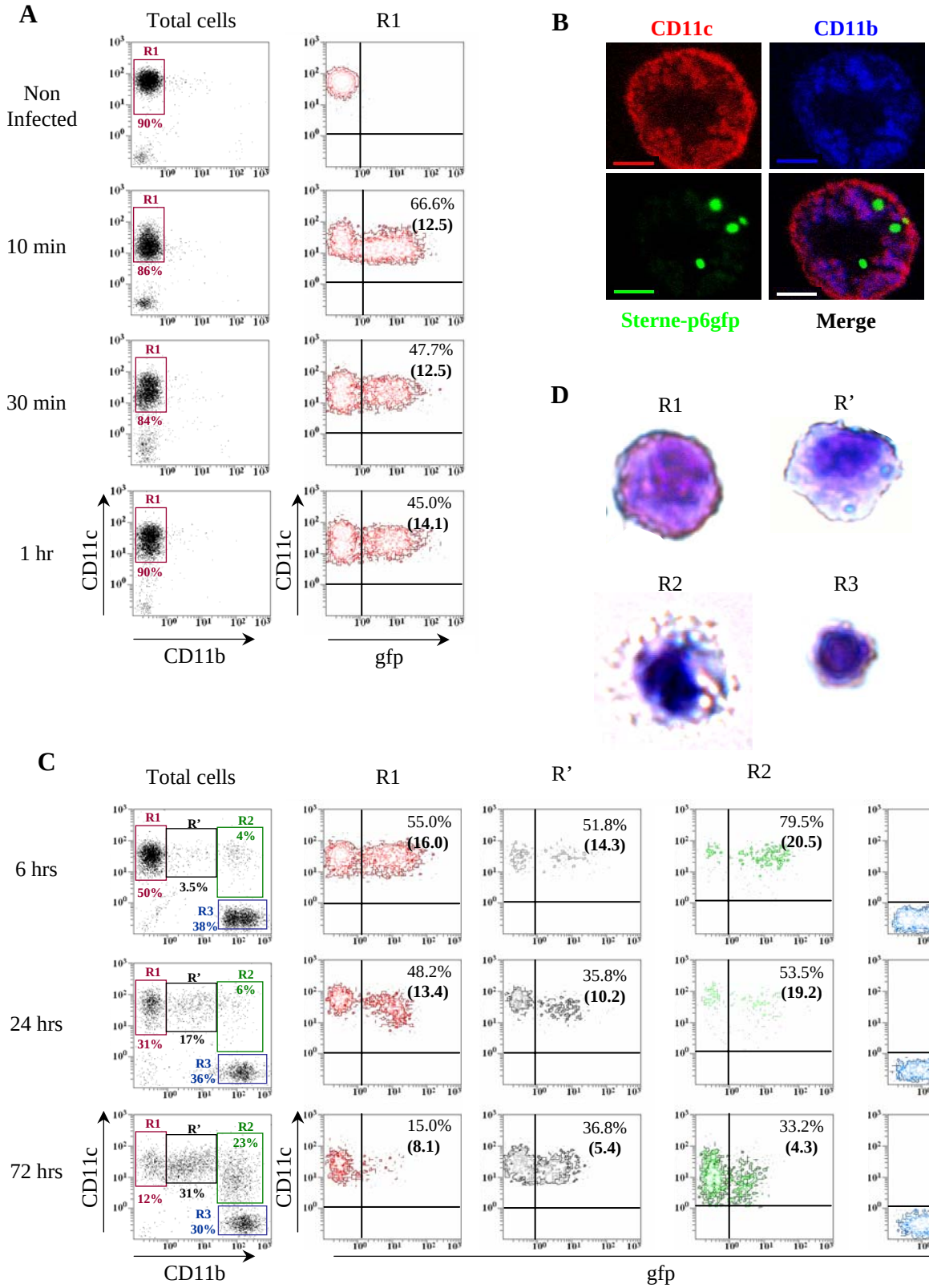
(B) Total lung cells were stained for CD11b and CD11c markers (upper left panel), and each population was gated on R1, R2 and R3 and examined for gfp fluorescence (upper right and lower panels). The percentage of gfp-positive cells is shown at the top right of each panel.

(C) Confocal microscopic analysis of gfp expression in the lung (left panel) and TLN (right panel).

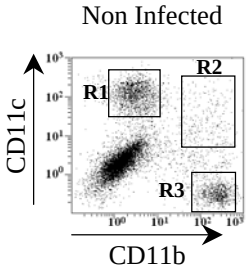
Figure 5: Kinetics of lung dendritic cell (LDC)-spore contact in the early stages of infection.

Analysis of LDC-spore contacts (arrows) in the lung (A) and transport to the draining thoracic lymph nodes (TLNs) (B) by confocal microscopy. Scale bars: 50 µm.

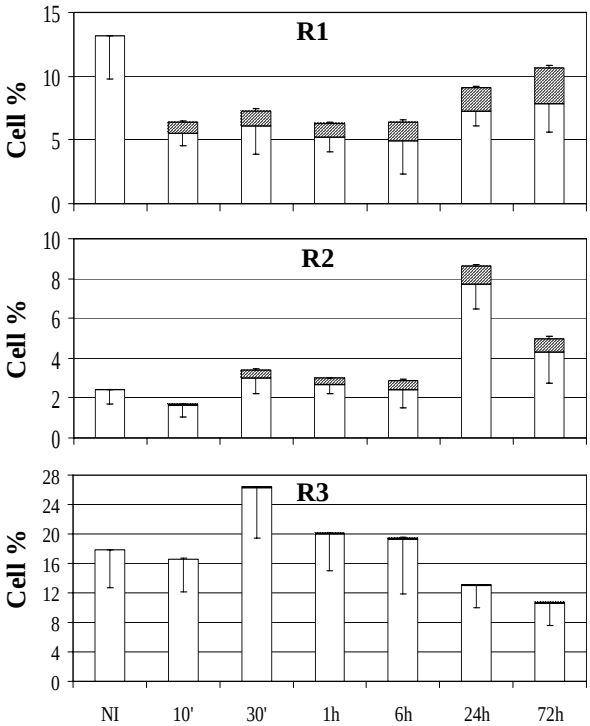
Photographs are representative of three independent experiments with similar results.


A
Total cells
R1
Non Infected
10 min
30 min
1 hr
R1
90%
86%
84%
90%
66.6%
(12.5)
47.7%
(12.5)
45.0%
(14.1)
CD11c
CD11b
gfp
B
CD11c
CD11b
Sterne-p6gfp
Merge
D
R1
R'
R2
R3
C
Total cells
R1
R'
R2
R3
6 hrs
24 hrs
72 hrs
R1
R'
R2
R3
50%
3.5%
4%
38%
31%
17%
6%
36%
12%
31%
23%
30%
55.0%
(16.0)
51.8%
(14.3)
79.5%
(20.5)
40.9%
(6.9)
48.2%
(13.4)
35.8%
(10.2)
53.5%
(19.2)
47.7%
(6.0)
15.0%
(8.1)
36.8%
(5.4)
33.2%
(4.3)
29.8%
(4.4)
CD11c
CD11b
gfp

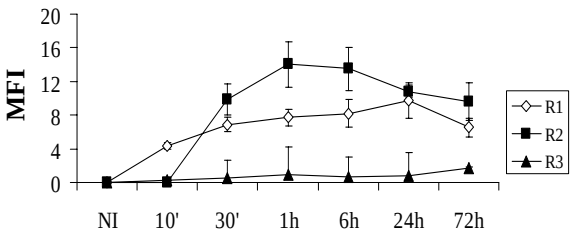
A


Non Infected
R1
R2
R3
CD11c
CD11b

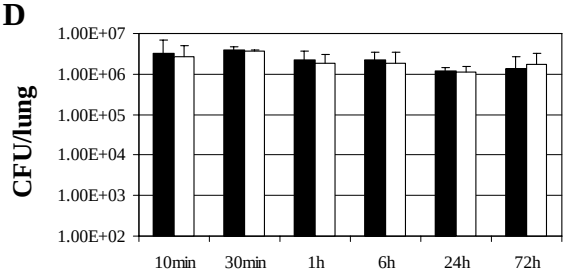
B


R1
R2
R3
Cell %
NI
10'
30'
1h
6h
24h
72h

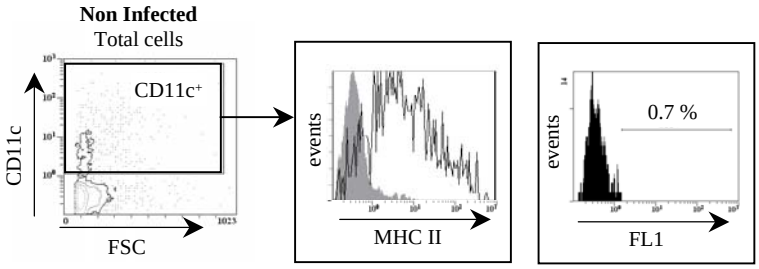
C


MFI
R1
R2
R3
NI
10'
30'
1h
6h
24h
72h

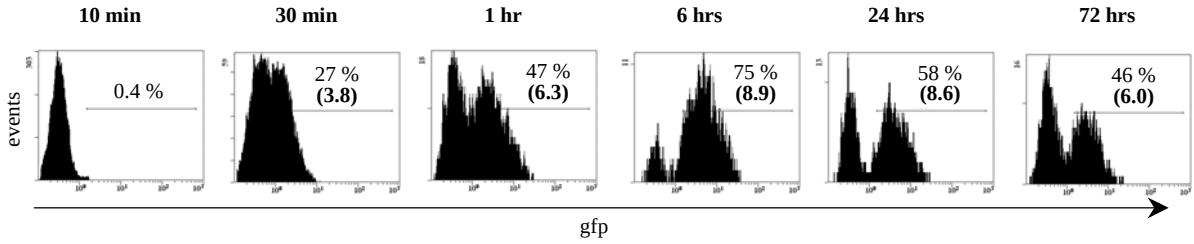
D

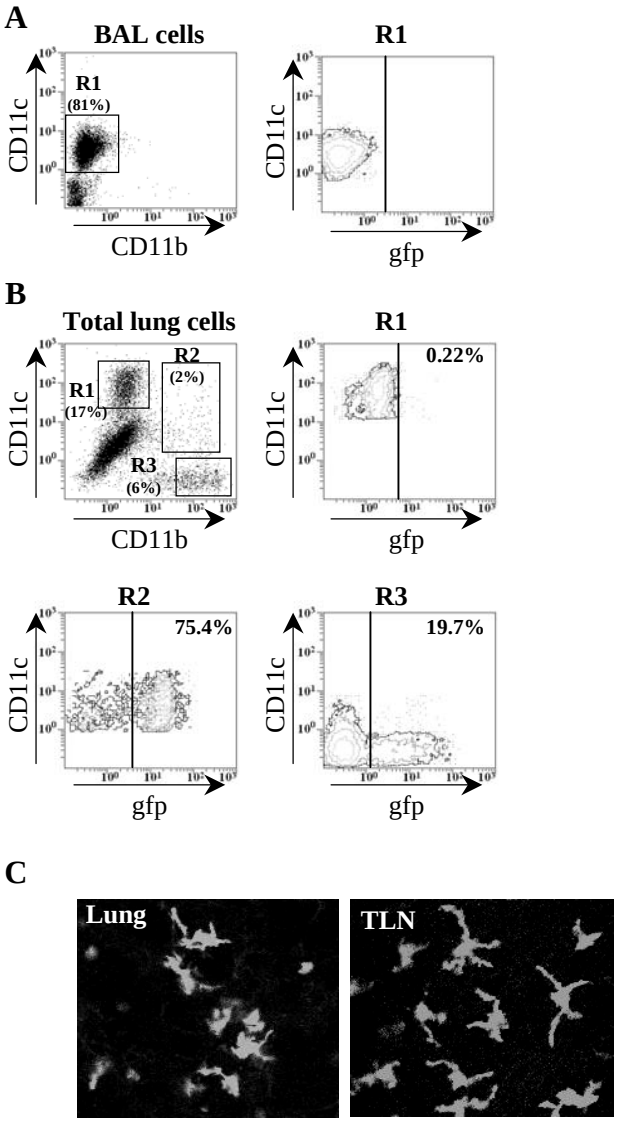

CFU/lung
10min
30min
1h
6h
24h
72h

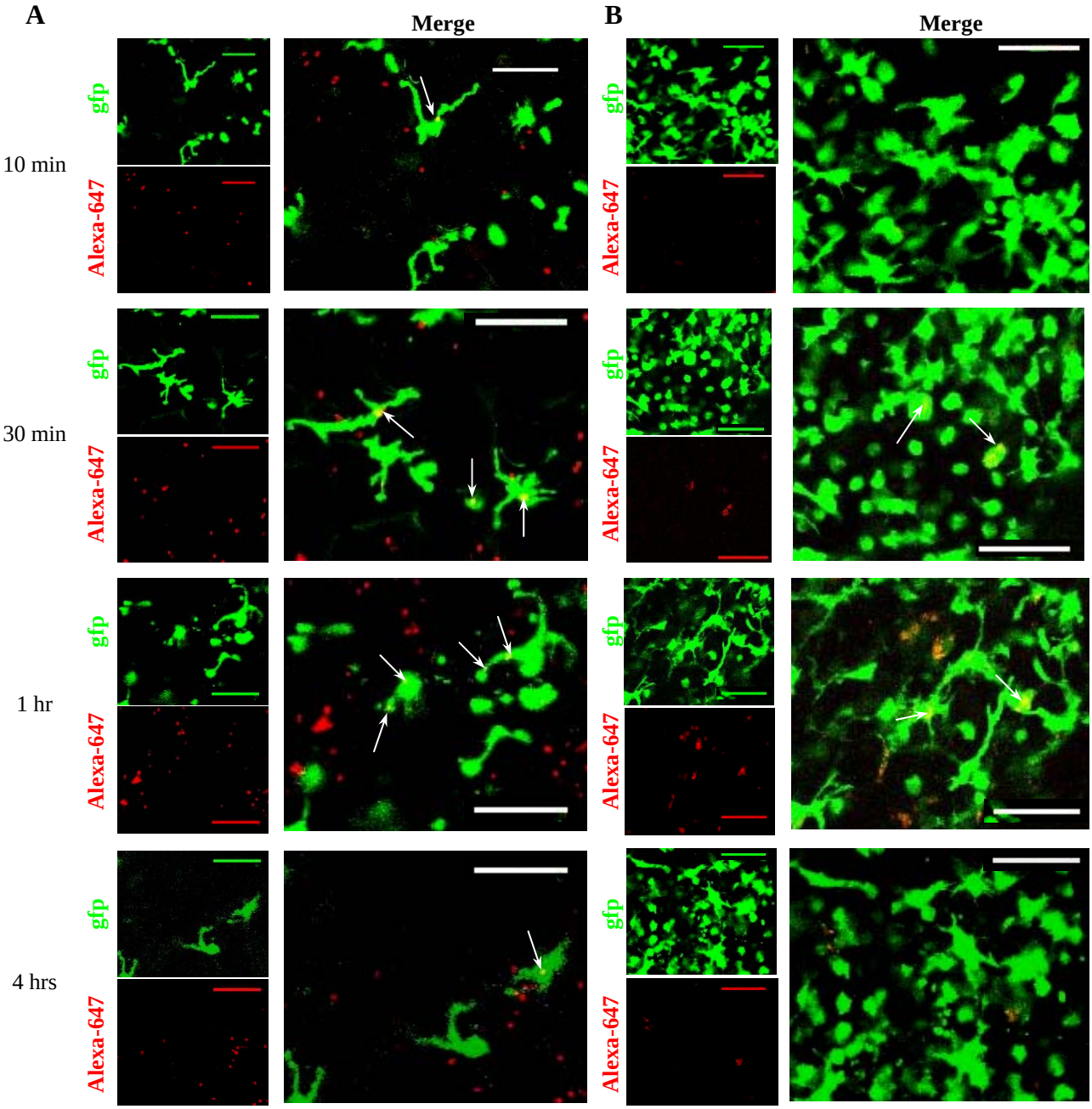
A


Non Infected
Total cells
CD11c+
CD11c
FSC
events
MHC II
events
0.7 %
FL1

B


10 min
30 min
1 hr
6 hrs
24 hrs
72 hrs
events
0.4 %
27 %
(3.8)
47 %
(6.3)
75 %
(8.9)
58 %
(8.6)
46 %
(6.0)
gfp


A
BAL cells
R1
(81%)
CD11c
CD11b
R1
CD11c
gfp
B
Total lung cells
R1
(17%)
R2
(2%)
R3
(6%)
CD11c
CD11b
R1
0.22%
CD11c
gfp
R2
75.4%
CD11c
gfp
R3
19.7%
CD11c
gfp
C
Lung
TLN


A
Merge
B
Merge
10 min
30 min
1 hr
4 hrs
gfp
Alexa-647

Article II

MAJOR ARTICLE

Resident CD11c$^+$ Lung Cells Are Impaired by Anthrax Toxins after Spore Infection

Aurélie Cleret,[1] Anne Quesnel-Hellmann,[1] Jacques Mathieu,[2] Dominique Vidal,[1] and Jean-Nicolas Tournier[1]

[1]Unité d'Immunobiologie, Département de Biologie des Agents Transmissibles, and [2]Unité de Radiobiologie et Inflammation, Département de Radiobiologie et de Radiopathologie, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, France

Bacillus anthracis **secretes 2 toxins: lethal toxin (LT) and edema toxin (ET). We investigated their role in the physiopathologic mechanisms of inhalational anthrax by evaluating murine lung dendritic cell (LDC) functions after infection with *B. anthracis* strains secreting LT, ET, or both or with a nontoxinogenic strain. Three lung cell populations gated on CD11c/CD11b expression were obtained after lung digestion: (1) CD11c^{high}/CD11b^{low} (alveolar macrophages), (2) CD11c$^{intermediate\ (int)}$/CD11b^{int} (LDCs), and (3) CD11c^{low}/CD11b^{high} (interstitial macrophages or monocytes). After infection with LT-secreting strains, a decrease in costimulatory molecule expression on LDCs was observed. All CD11c$^+$ cells infected with a nontoxinogenic strain secreted tumor necrosis factor (TNF)–α, interleukin (IL)–10, and IL-6. LT-secreting strains inhibited overall cytokine secretion, whereas the ET-secreting strain inhibited only TNF-α secretion and increased IL-6 secretion. Similar results were obtained after preincubation with purified toxins. Our results suggest that anthrax toxins secreted during infection impair LDC function and suppress the innate immune response.**

Bacillus anthracis is a gram-positive, spore-forming bacterium and is the causal agent of zoonotic anthrax disease. It has recently become a major concern, after its use as a bioweapon in terrorist attacks in 2001. *B. anthracis* has 2 major virulence factors: (1) the capsule encoded by the plasmid pXO2 and (2) the 2 toxins produced by the association of 3 factors encoded by the plasmid pXO1. These 3 factors are protective antigen (PA), lethal factor (LF), and edema factor (EF). PA associates with LF to form lethal toxin (LT) and associates with EF to form edema toxin (ET). PA binds to at least 2 cellular receptors and, after being cleaved by a furin-like protease, self-assembles to form a heptameric prepore that facilitates the entry of LF/EF moieties into the cytosol, where they exert their toxic activities [1]. LF is a zinc-dependent metalloprotease that cleaves most of the mitogen-activated protein kinase kinases [2], whereas EF is a calcium- and calmodulin-dependent adenylate cyclase that increases intracellular cAMP concentration [3, 4].

The pathogenesis of inhalational anthrax disease, especially the crucial step of crossing the alveolocapillar space, is not well understood [5, 6]. Inhaled spores are phagocytosed in the alveolar spaces by antigen-presenting cells (APCs). Phagocytes then carry the spores from the alveolus to the mediastinal lymph nodes [7, 8]. The spores germinate within their intracellular niche and release vegetative bacteria extracellularly, which causes septicemia associated with a release of the toxins and, ultimately, causes host death. For decades, research focused on alveolar macrophages (AMs), which were thought to be the "Trojan horse" for the pathogen [9]. However, AMs are not thought to play a role in antigen traffic to lymph nodes [10]. Also, macrophage-depleted mice are still susceptible to aerosol infection, demonstrating the crucial role of another, as-yet-unidentified population of cells [11]. Resident lung dendritic cells

Received 18 November 2005; accepted 4 February 2006; electronically published 26 May 2006.

Presented in part: 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, MA, 25–30 June 2005 (abstract 53928).

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Délégation Générale pour l'Armement (grant CO 010808); Service de Santé des Armées (135OP3B LFR EMA).

Reprints or correspondence: Dr. Jean-Nicolas Tournier, Unité d'Immunobiologie, Département de Biologie des Agents Transmissibles, CRSSA, 24 ave. des maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche, France (jntournier@crssa.net).

The Journal of Infectious Diseases 2006;194:86–94
© 2006 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2006/19401-0013$15.00

(LDCs) are strong candidates for this population, since they have been clearly identified among the various lung phagocytes.

A crucial function of LDCs is to capture antigens at alveolar sites and deliver them to mediastinal lymph nodes to mount an efficient adaptive immune response [12]. Previous studies have shown that LT impairs murine bone marrow–derived, spleen-derived, and human monocyte–derived DC cytokine secretion [13–16]. Although these studies have shown the host response mechanism to the pathogen, they have given no clue as to the early interactions after inhalation of the spores, because pulmonary-tract APCs have particular phenotypic and functional properties. For example, the CD11c antigen (integrin $\alpha_x\beta_2$) is expressed by both LDCs and AMs, whereas it is expressed only by DCs in other organs [17–20]. Therefore, several studies have shown that the purification of lung parenchymal cells results in several APC populations, depending on the expression of CD11c and CD11b [17, 19] or CD11c and MHC class II molecules [18]. Also, pulmonary CD11c$^+$ cells usually can secrete high levels of anti-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)–10 [21], and of proinflammatory cytokines, such as IL-6 [22] and tumor necrosis factor (TNF)–α. These special functional abilities of CD11c$^+$ cells could be related to the need to protect an infected lung from inflammatory injuries.

Given the particular characteristics of LDCs, we hypothesized that anthrax toxins could have significantly different effects on LDCs than on bone marrow–derived DCs (BMDCs). By focusing on LDCs, we were able to obtain more-accurate data on the early effects that toxins have on the primary interactions between *B. anthracis* spores and resident lung cells. This should provide more physiological data on the early effects of each anthrax toxin after inhalation.

Here, we show that LDCs are more efficient than AMs at phagocytosing anthrax spores. Moreover, phagocytosis of LT-secreting spores inhibited LDC maturation and impaired overall cytokine secretion by CD11c$^+$ cells. In contrast, phagocytosis of ET-secreting spores did not affect LDC maturation but inhibited the secretion of TNF-α and up-regulated the secretion of IL-6. Our results strongly suggest that anthrax toxins have specific effects on LDCs.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Male 6–12-week-old BALB/c (H-2^d) mice (Janvier) were housed in clean, standard conditions at our animal-care facility. The local ethics committee approved our animal experiments.

B. anthracis *strains.* We used the following *B. anthracis* strains: the parental Sterne strain 7702 (pXO1$^+$); single-mutant derivatives RP10 Δ*lef* and RP9 Δ*cya,* which secrete PA-EF and PA-LF, respectively [23]; and double-mutant RP42 Δ*lef*/Δ*cya,* which secretes PA only [24] (all from M. Mock, Institut Pasteur, Paris, France).

Isolation of CD11c$^+$ cells from lung and generation of BMDCs. BALB/c mice were killed, and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 4 times, by intratracheal instillation of 1 mL of PBS (Gibco; Invitrogen) supplemented with 2 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich). The thoracic cavity was opened, and lungs were perfused with 5 mL of PBS–2 mmol/L EDTA via the right ventricular cavity of the heart. The lungs were aseptically removed, cut into small pieces, and digested twice, in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) containing collagenase type I (1 mg/mL; Worthington Biochemical) and DNAse I (50 U; Sigma-Aldrich), by incubation for 30 min in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Enzyme activity was stopped by washing the digested tissues in PBS–10 mmol/L EDTA for 10 min on ice. The digested lungs were further disrupted by gently forcing the tissue through 2 nylon screens (pore size, 70 μm and 40 μm; BD Biosciences). After red-blood-cell lysis (in NH_4Cl solution), cells were separated using CD11c microbeads (Miltenyi Biotec). We collected the positive fraction, and cell suspensions were counted and viability assessed by trypan-blue exclusion. All reagents used for isolation and culture of cells were certified as being endotoxin free. BMDCs were generated as described elsewhere [15, 25].

In vitro infection and toxin-exposure conditions. CD11c$^+$ cells were seeded at 1.5×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and 2 mmol/L L-glutamine (Sigma-Aldrich) for 1 h in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Spores of *B. anthracis* were heat activated (70°C for 10 min), and cells were infected with the spores for 1 h at an MOI of 20 [15, 26, 27]. The cells were washed twice in RPMI supplemented with 2.5 μg/mL gentamycin (Invitrogen) to kill any remaining extracellular bacteria [26] and were resuspended in RPMI–5% FBS–gentamycin. After 17 h of culture, followed by centrifugation, supernatants were sampled, and cells were harvested. Noninfected CD11c$^+$ lung cells were used as negative controls.

For intoxication with purified toxins, the CD11c$^+$ cells were preincubated with PA (1 μg/mL) and/or LF and/or EF at either 1 or 10 ng/mL (all 3 components from List Biological Laboratories) for 2 h. RP42 (LT$^-$/ET$^-$) strain spores were added and incubated for 1 h at an MOI of 20. Cells were then washed twice. Fresh culture medium containing gentamycin (2.5 μg/mL) was added, and the culture supernatants and cells were sampled 17 h later. BMDCs were seeded at 1.5×10^6 cells/mL and infected as described above.

Phenotypic analysis. Cells were incubated with FcR blocking antibody (anti–mouse CD16/CD32 antibody, clone 2.4G2; BD Biosciences) to reduce nonspecific binding. We used the following monoclonal antibodies (MAbs; all from BD Biosciences): anti–I-A^d–fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone AMS-32.1), anti–CD86-FITC (B7-2, clone GL1), anti–I-A/I-E–

phycoerythrin (PE) (clone M5/114.15.2), anti–CD40-PE (clone 3/23), anti–CD80-PE (B7-1, clone 16-10A1), anti–CD11b-FITC or -PE (clone M1/70), and anti–CD11c-biotin (clone HL3). Cells were incubated for 30 min at 4°C with different combinations of MAbs. APC-conjugated streptavidin was used after incubation with biotinylated MAb. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde before analysis.

Phagocytosis analysis. Sterne spores were heat activated (70°C for 10 min) before incubation for 30 min on ice with FITC-labeled anti-BclA MAb (4B7G12; obtained from P. Sylvestre, Institut Pasteur, Paris, France). Cells were preincubated with anti-CD16/32 antibodies to avoid receptor Fc–mediated phagocytosis and were infected for 30 min at 37°C with the Sterne spores stained by anti-BclA antibodies at an MOI of 20. The cells were washed twice and stained for CD11c and CD11b markers as described above. The cells were fixed before analysis.

Cytokine and chemokine measurement in supernatants and TNF-α intracellular staining. TNF-α was measured in 18-h cell-culture supernatants by use of ELISA kits (R&D Systems). IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, and monocyte chemoattractant protein (MCP)–1 were measured using a cytometric-bead-array multiplex detection system (BD Biosciences).

For intracellular staining, $CD11c^+$ cells were infected as described above. After 1 h in medium supplemented with gentamycin (2.5 μg/mL), brefeldin A (5 μg/mL) was added as described elsewhere [25]. Cells were labeled with CD11c and CD11b surface markers as described above and with an intracellular TNF-α–PE MAb (BD Biosciences) for 1 h at 4°C. The cells were fixed before analysis.

Flow cytometry and statistical analysis. Cell acquisition was performed on a FC500 (Beckman Coulter), and the data were analyzed by CXP software (version 2.0; Beckman Coulter). The cell distributions were compared using the Kolmogorov-Smirnov test.

Statistical analysis was performed using SigmaStat software (version 3.0; Systat). Statistical differences between the groups were determined by a factorial analysis of variance (1-way analysis of variance; Holm-Sidak method).

RESULTS

Characterization of LDCs in BALB/c mice. We first characterized the major subsets of APCs present in murine lungs. We performed flow cytometry, using antibodies against the CD11b and CD11c antigens that are known to be differentially expressed by AMs and LDCs [17, 28]. After digestion, total lung cells showed 3 different CD11c/CD11b expression patterns, as has been demonstrated in previous studies (figure 1*A*) [17–19]. The AMs, which represented 14.6% of the total cells, characteristically expressed $CD11c^{high}/CD11b^{low}$ markers. LDCs (3.5%) represented the double-positive population and expressed intermediate (int) levels of the 2 markers. A third population of cells expressed only the CD11b marker (10.3%). These cells were either interstitial macrophages (IMs) [28] or monocytes, as has been proposed elsewhere [18, 29]. The BAL samples contained a large $CD11c^{high}/CD11b^{low}$ population (64.4%) (figure 1*A*). Furthermore, these cells were highly autofluorescent (data not shown), which was consistent with previous data showing that BAL fluid contains mainly AMs [30] and confirmed the AM phenotype observed in the total lung cells.

We next looked at purified AMs and LDCs from lungs. These are thought to play a crucial role in inhalational anthrax. We isolated these 2 APC subsets by using magnetic microbeads to separate cells expressing CD11c. After purification, we obtained enriched populations of $CD11c^+$ total lung cells (figure 1*B*): AMs ($CD11c^{high}/CD11b^{low}$) represented 67.5% and LDCs ($CD11c^{int}/CD11b^{int}$) represented ~10% of the purified cells. We could clearly identify these populations on the basis of cell autofluorescence and the expression of MHC class II molecules [18, 19]. The AMs (gate R1) were highly autofluorescent and did not express MHC class II molecules (figure 1*C, panel R1*), whereas the LDCs (gate R2) were less autofluorescent and expressed an intermediate level of MHC class II molecules (figure 1*C, panel R2*). Freshly isolated LDCs showed an immature phenotype with no expression of the costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86 (figure 1*D*). However, after overnight culture, the expression of CD80, CD86, and MHC class II molecules was up-regulated in these LDCs (figure 1*D*) [31].

***Infection of $CD11c^+$ cells by spores of* B. anthracis.** We studied the early events of inhalational anthrax by infecting $CD11c^+$ lung cells, at an MOI of 20, with spores of the Sterne strain (LT^+/ET^+) or one of its derivative mutants, RP9 (LT^+/ET^-), RP10 (LT^-/ET^+), and RP42 (LT^-/ET^-). We assessed cell viability by 7-aminoactinomycin D (7-AAD) staining after 18 h of culture. We found that the different strains did not affect either cell viability or the expression of CD40 and CD80 markers (data not shown).

We next compared the efficiency of each major lung APC population in the phagocytosis of anthrax spores (figure 2*A*). We observed that more LDCs than AMs phagocytosed anthrax spores (84% ± 3.5% vs. 61% ± 9%, respectively). Moreover, LDCs phagocytose more anthrax spores than do AMs, as assessed by the mean fluorescence intensity (MFI) ($P < .000001$, Kolmogorov-Smirnov test). Spore phagocytosis was also less efficient for IMs and AMs from BAL fluid (figure 2*B*). These results suggest that LDCs were the most efficient lung APCs in the phagocytosis of anthrax spores.

Effects of toxins on LDC maturation after spore infection or intoxication. We then specifically focused on LDCs, by gating the analysis on $CD11c^+$ cells after magnetic selection. After 18 h of culture, we observed that a subset of noninfected $CD11c^{int}/CD11b^{int}$ LDCs (~2%–5% of the population) spontaneously expressed high levels of MHC class II molecules and

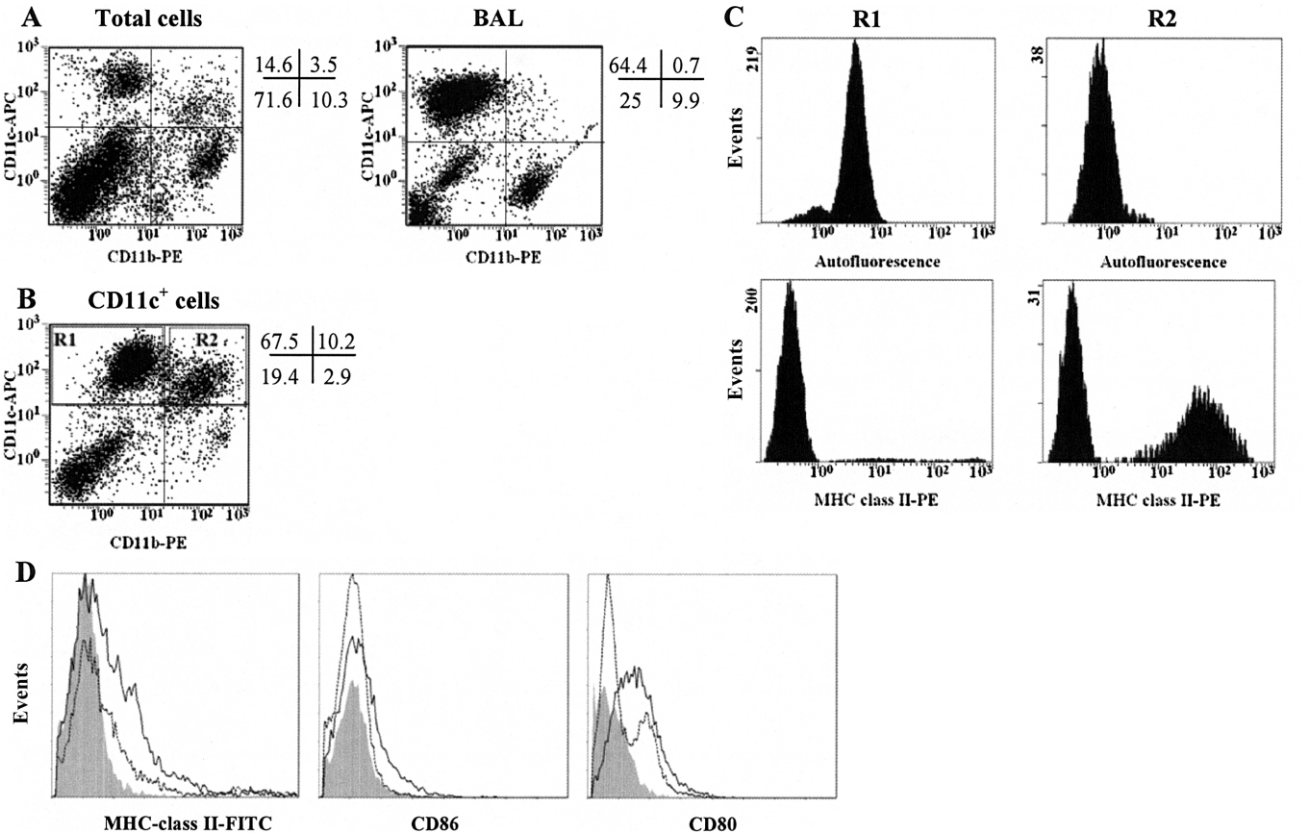


Figure 1. Characterization of lung dendritic cells (LDCs) in BALB/c mice. *A,* Total lung cells and cells from bronchoalveolar lavage fluid (BAL) were stained for CD11b and CD11c markers. Values at the top right of each panel are the percentages of cells in each quadrant. *B,* CD11b/CD11c expression pattern of purified CD11c$^+$ cells; gate R1 represents the alveolar macrophages (AMs), and gate R2 represents the LDCs. Values at the top right of each panel are the percentages of cells in each quadrant. *C,* Autofluorescence (analyzed in the canal FL1) and MHC class II expression of AMs *(R1)* and LDCs *(R2)* after positive selection with CD11c microbeads. *D,* Expression of MHC class II molecules and costimulatory molecules CD86 and CD80 by freshly isolated CD11c$^+$ lung cells *(dashed line)* and after overnight culture *(unshaded portion of histogram)*; shading indicates isotype control staining. Results shown are representative of 3 independent experiments. APC, allophycocyanin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin.

CD86 costimulatory molecules (figure 3*A* and 3*B*). This LDC subset was observed after infection by both the atoxinogenic strain RP42 (LT$^-$/ET$^-$) and the ET-secreting strain RP10 (LT$^-$/ET$^+$) (4.63% and 4.28%, respectively) (figure 3*A*). In contrast, the percentage of this LDC subset was decreased after infection by both LT-secreting strains, RP9 (LT$^+$/ET$^-$) and Sterne (LT$^+$/ET$^+$) (to 0.61% and 0.66%, respectively).

Therefore, we preincubated the CD11c$^+$ lung cells with purified toxins, to confirm the direct effect of LT on LDCs during infection. Preincubation with either PA or ET only (1 or 10 ng/mL) did not change the highly mature double-positive MHC class II$^+$/CD86$^+$ population subset (figure 3*B*). In contrast, the percentage of this subset decreased in a dose-dependent manner after treatment with LT (to 1.00% at 1 ng/mL of LT and to 0.29% at 10 ng/mL of LT). Furthermore, after treatment with ET and LT together at 1 ng/mL, the highly mature cell subset was not as affected as after treatment with LT alone (1.44% for the ET-LT group vs. 1.00% for the LT group). However, when the ET-LT concentrations reached 10 ng/mL, we observed the same decrease as for LT at 10 ng/mL alone (to 0.21% and 0.29%, respectively).

We next assessed the effect of LT on BMDCs. The atoxinogenic strain induced a mature double-positive MHC class II^{high}/CD86^{high} population. However, none of the LT- and/or ET-secreting strains affected this cell subset (figure 3*C*). The same results were obtained after intoxication (data not shown). These results suggested that LT specifically impairs LDC maturation.

Effects of toxins on CD11c$^+$ lung cell cytokine secretion after spore infection or intoxication. We assessed in parallel the secretion of cytokines (TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12p70, and IFN-γ) and of the chemokine MCP-1, 18 h after infection, in the CD11c$^+$ lung cell supernatants. After infection with the atoxinogenic strain, RP42 (LT$^-$/ET$^-$), the CD11c$^+$ lung cells secreted proinflammatory cytokines (TNF-α and IL-6) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 (figure 4*A*), but they did not secrete significant levels of IL-12p70, IFN-γ, or MCP-1 (data not shown).

After infection with a strain either secreting both toxins

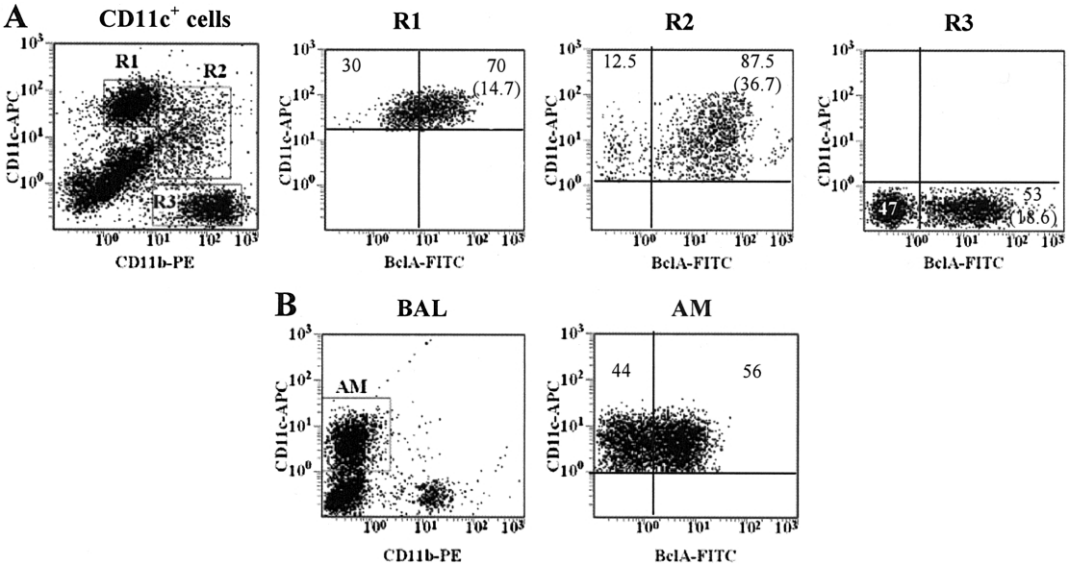


Figure 2. Infection of CD11c+ cells by *Bacillus anthracis* spores. *A,* Phagocytosis of Sterne spores stained for exosporium BclA protein by CD11c+ cells. The different cell populations were gated on the expression of CD11b/CD11c markers *(upper panels):* alveolar macrophages (AMs) *(R1),* lung dendritic cells (LDCs) *(R2),* and interstitial macrophages (IMs) *(R3);* fluorescence in canal FL1 was also analyzed *(R1–R3).* Values in the quadrants are the percentages of cells, and values in parentheses are the mean fluorescence intensities (MFIs) of the positive cells. The percentages of positive cells in R1 and R2 are significantly different ($P < .000001$, Kolmogorov-Smirnov test). *B,* Phagocytosis of fluorescein isothiocyanate (FITC)–labeled Sterne spores by AMs. The major cell population of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was gated on the expression of CD11b/CD11c markers *(left),* and fluorescence in the canal FL1 was analyzed *(right).* Values in the quadrants are the percentages of cells. Results shown are representative of 2 independent experiments. APC, allophycocyanin; PE, phycoerythrin.

(Sterne [LT^+/ET^+]) or secreting LT only (RP9 [LT^+/ET^-]), overall cytokine secretion was inhibited (figure 4*A*). After infection with the ET-secreting strain, RP10 (LT^-/ET^+), we observed that TNF-α secretion was intermediately inhibited and that IL-6 secretion was up-regulated, compared with the atoxinogenic strain. We did not observe any modification of IL-10 secretion after infection with the RP10 strain.

CD11c+ lung cell supernatants were analyzed using the same multiplex detection system 18 h after preincubation with purified toxins (figure 4*B*). We observed that control CD11c+ lung cells infected with RP42 (LT^-/ET^-) spores secreted high levels of TNF-α, IL-6, and IL-10. Preincubation with PA alone did not modify cytokine secretion, compared with that in the control group. However, preincubation with LT inhibited cytokine secretion by these cells. In contrast, incubation of CD11c+ lung cells with ET did not affect IL-10 or IL-6 secretion, whereas we observed an intermediate inhibition of TNF-α secretion. The combination of LT and ET at 10 ng/mL inhibited all cytokines. These results were highly consistent with our data showing the effect of infection with spores secreting or not secreting the toxins.

Simultaneously, we analyzed the effect of LT-secreting strains on BMDCs (figure 4*C*). As was observed for LDCs, BMDCs secreted high levels of TNF-α and IL-10 after infection with the atoxinogenic strain. In contrast to LDCs, they also secreted IL-12p70, a major Th1-inducing cytokine. The LT-secreting strains (Sterne and RP9) inhibited overall cytokine secretion, whereas the ET-secreting strain (RP10) inhibited TNF-α secretion, did not modify IL-12p70 secretion, and enhanced IL-10 secretion, in contrast to the effect seen in LDCs.

Cytokine detection in supernatants reflects secretion by a heterogeneous cell population. To discriminate each cell population, we investigated the regulation of TNF-α secretion at the single-cell level by intracellular staining. We focused on AMs and LDCs by gating the population for CD11b and CD11c expression, as described above (figure 5*A*). Our results showed that both AMs and LDCs secreted TNF-α (figure 5*B*). Infection with the Sterne (LT^+/ET^+) strain inhibited TNF-α secretion by both AMs and LDCs, compared with the RP42 strain. We observed a decrease in TNF-α^+ cell percentage ($P < .000001$, Kolmogorov-Smirnov test), as well as in TNF-α MFIs ($P < .000001$, Kolmogorov-Smirnov test), for each population. These results showed that the toxinogenic Sterne strain inhibited TNF-α secretion at the single-cell level.

DISCUSSION

In our study, we investigated—for the first time, to our knowledge—the effects of toxins after incubation of relevant LDCs with *B. anthracis* spores. Early events in *B. anthracis* infection are thought to be crucial for the outcome of the infection, because the immune responses were completely abolished in

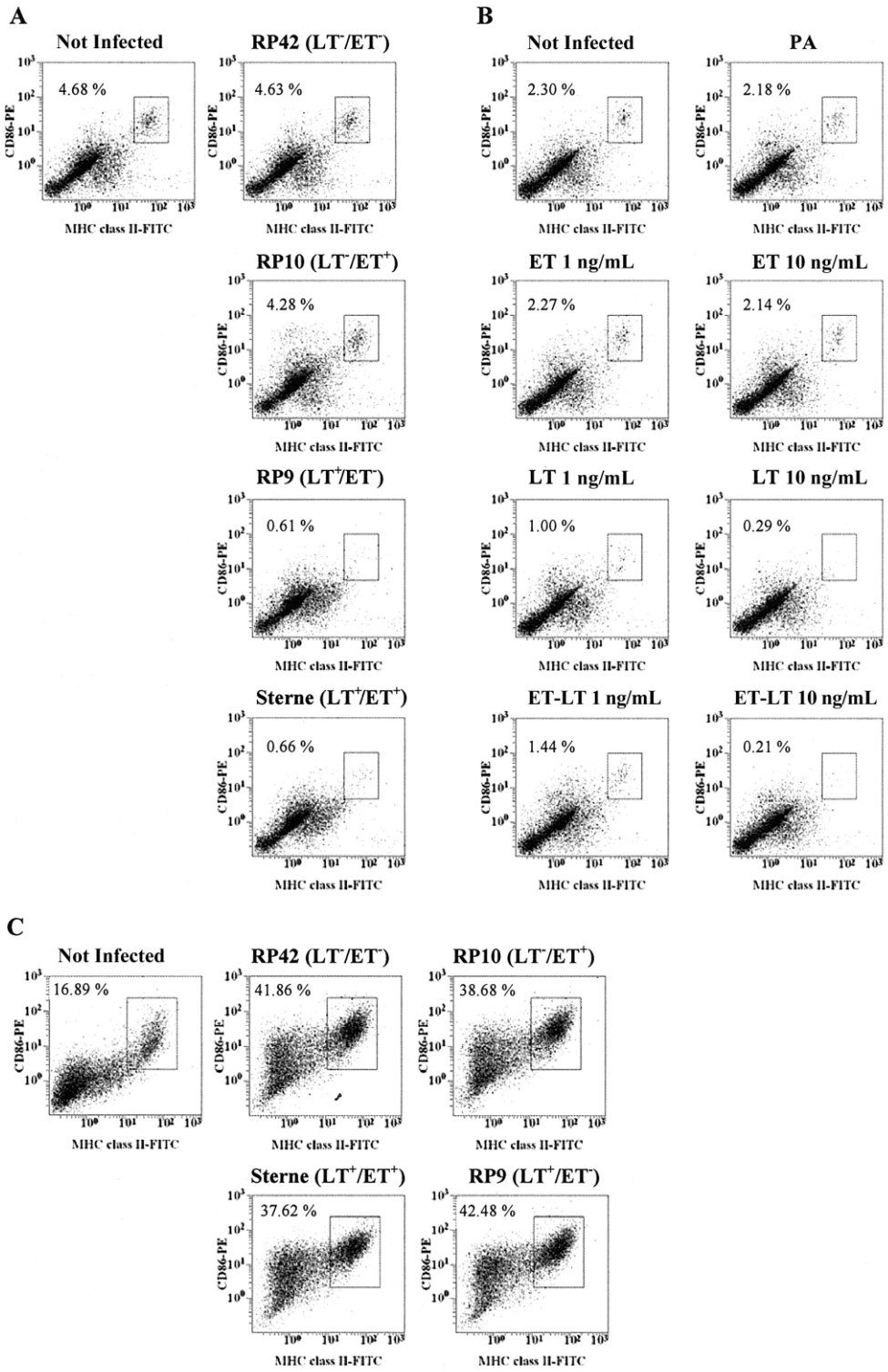


Figure 3. Effect of toxins on CD11c⁺ cell maturation after spore infection *(A)* or intoxication *(B)* and on bone marrow–derived dendritic cell (BMDC) maturation after spore infection *(C). A,* Phenotype analysis of the mature subset of lung dendritic cells (LDCs) after infection with RP42 (lethal toxin $[LT]^-$/edema toxin $[ET]^-$), RP10 (LT^-/ET^+), RP9 (LT^+/ET^-), and Sterne (LT^+/ET^+) spores for 18 h. Data were gated on $CD11c^+$ cells. *B,* Phenotype analysis of the mature subset of LDCs after preincubation with protective antigen (PA), edema factor (EF), and/or lethal factor (LF) at 1 or 10 ng/mL for 2 h and infection with RP42 (LT^-/ET^-) spores for 18 h. Data were gated on $CD11c^+$ cells. *C,* Phenotype analysis of the mature subset of BMDCs after infection with RP42 (LT^-/ET^-), RP10 (LT^-/ET^+), RP9 (LT^+/ET^-), and Sterne (LT^+/ET^+) spores for 18 h. Values in the quadrants are the percentages of double-positive cells in the gate. Results shown are representative of 3 independent experiments. FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin.

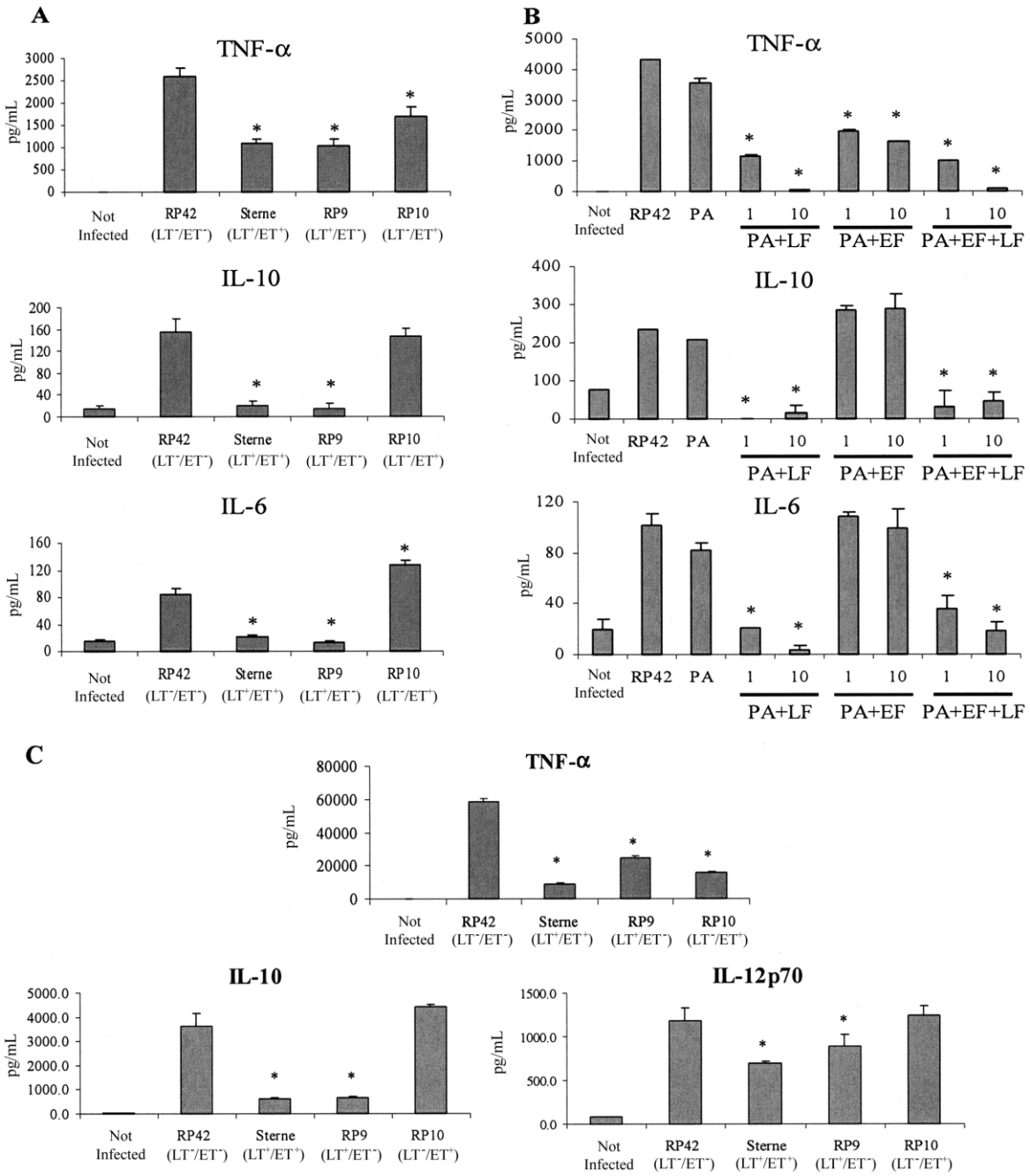


Figure 4. Effect of toxins on CD11c$^+$ lung cell cytokine secretion after spore infection *(A)* or intoxication *(B)* and on bone marrow–derived dendritic cell (BMDC) cytokine secretion after spore infection *(C). A,* Edema toxin (ET) and lethal toxin (LT) secreted during *Bacillus anthracis* infection differentially impair cytokine secretion by CD11c$^+$ lung cells. CD11c$^+$ cells were infected with spores of RP42 (LT$^-$/ET$^-$), Sterne (LT$^+$/ET$^+$), RP9 (LT$^+$/ET$^-$), or RP10 (LT$^-$/ET$^+$) strains. Tumor necrosis factor (TNF)–α concentration was measured in culture supernatants after 18 h by ELISA (R&D Systems). Interleukin (IL)–10 and IL-6 secretion was assessed using a multiplex detection system. *B,* Differential impairment of CD11c$^+$ lung cell cytokine secretion by purified ET and LT. CD11c$^+$ cells were preincubated with protective antigen (PA), edema factor (EF), and/or lethal factor (LF) at 1 or 10 ng/mL for 2 h and infected with spores of the RP42 (LT$^-$/ET$^-$) strains. Cytokine concentrations were measured in culture supernatants after 18 h, as described above. *C,* Impairment of BMDC cytokine secretion by ET and LT secreted during *B. anthracis* infection. Cells were infected with spores of RP42 (LT$^-$/ET$^-$), Sterne (LT$^+$/ET$^+$), RP9 (LT$^+$/ET$^-$), or RP10 (LT$^-$/ET$^+$) strains. TNF-α concentration was measured in culture supernatants after 18 h by ELISA. IL-10 and IL-12p70 were assessed using a multiplex detection system. Data are mean $\pm$ SD cytokine concentrations representative of 3 independent experiments. *$P < .0001$, vs. RP42 group.

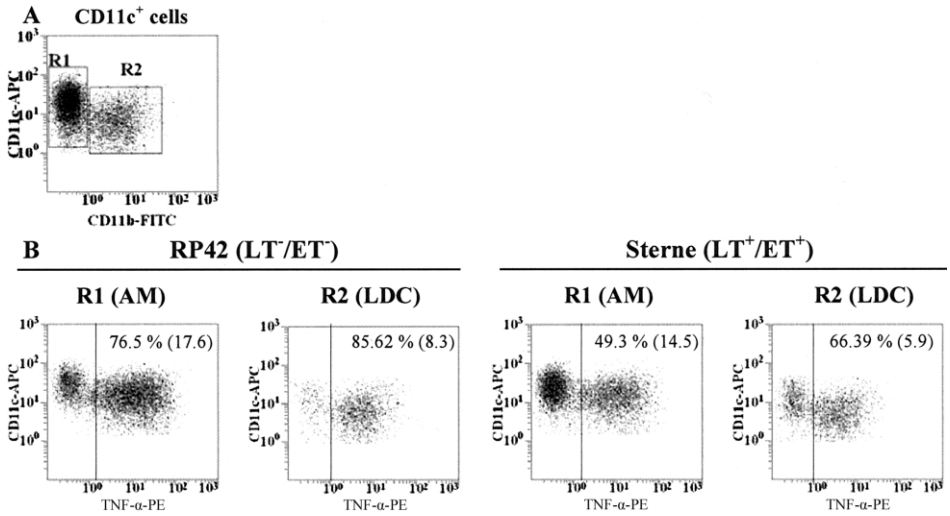


Figure 5. Intracellular tumor necrosis factor (TNF)–α secretion by CD11c$^+$ cells after spore infection. *A,* CD11b/CD11c expression pattern of CD11c$^+$ cells: alveolar macrophages (AMs) (gate R1) and lung dendritic cells (LDCs) (gate R2). *B,* Impairment of TNF-α secretion by AMs and LDCs, as a result of edema toxin (ET) and lethal toxin (LT) secreted during *Bacillus anthracis* infection. CD11c$^+$ cells were infected with RP42 (LT$^-$/ET$^-$) or Sterne (LT$^+$/ET$^+$) spores. TNF-α secretion was analyzed at the single-cell level by intracellular staining. Values in the quadrants are the percentages of cells; values in parentheses are mean fluorescence intensities of positive cells. Results are representative of 3 independent experiments. APC, allophycocyanin; PE, phycoerythrin.

patients who died during the 2001 outbreak of inhalational anthrax [32]. We show that LT and ET impair early LDC functions and show that toxins may play a crucial role in switching off the immune response in inhalational anthrax infection.

This is the first study showing how anthrax toxins act after infection of LDCs. Most previous studies have used AMs, because these cells, which are the major cell population in BAL samples, are easier to isolate [27] and because only very recently has a clear distinction between the different subpopulations of CD11c$^+$ cells in murine lungs been described [17–20]. Here, we show that multiparametric analysis of the cellular populations present in the whole lung is essential for differentiating the LDCs and the AMs. These 2 populations have important phenotypic and functional differences. We have discriminated between LDCs and AMs on the basis of their expression of CD11b/CD11c antigens and MHC class II molecules, as well as their autofluorescence. Using this strategy, we are able to study the differential expression of maturation markers, such as CD86 and MHC class II molecules, by LDCs, in addition to spore phagocytosis.

Our results show that LDCs are significantly more efficient than AMs for spore phagocytosis. This has several consequences with regard to host-pathogen interactions. Because LDCs are able to migrate to the mediastinal lymph nodes, their increased capacity to phagocytose spores makes it easier for the pathogen to cross the alveolocapillar wall. A previous study has shown that secretion of anthrax toxin by the germinated spores enables *B. anthracis* to kill from within [33]. Therefore, the greater ability of LDCs to phagocytose spores may provide a strong advantage for the pathogen to spread by the pulmonary route.

LDCs are also highly sensitive to LT. We observed that LT inhibits, in a dose-dependent manner, maturation characterized by the coexpression of CD86 and MHC class II molecules. This maturation inhibition may lead to an aberrant ability to activate and coordinate the adaptive immune response. The presentation of antigens in this way could lead to an anergy of the specific T cell clone or to the development of T regulator cells.

Finally, ET and LT have very different effects on CD11c$^+$ lung cells. LT inhibited the secretion of IL-6, IL-10, and TNF-α. Although ET inhibited the secretion of TNF-α, it did not affect IL-10 secretion, and IL-6 secretion was enhanced. A previous study has shown that human monocytes stimulated by lipopolysaccharide and incubated with ET have enhanced IL-6 secretion [34]. The high levels of IL-6 and IL-10 secretion observed with ET clearly favor the development of a Th2 immune response. We have previously shown that ET has a strong adjuvant effect on the humoral and PA response that could be linked to a Th2 shift [35]. Indeed, it has been specifically shown that IL-6 secreted by APCs polarizes T cells toward a Th2 response [22], whereas IL-10 secretion mediates tolerance [21]. ET may further trigger the development of T regulator cells, as has previously been shown for cholera toxin, another bacterial toxin that increases intracellular cAMP concentration [36].

We did not observe phenotypic maturation inhibition in BMDCs. Furthermore, we observed very different cytokine secretion patterns for lung CD11c$^+$ cells and BMDCs. These re-

sults stress the need to evaluate the effects of toxins in relevant cells.

Finally, the results presented here describe the effects of *B. anthracis* toxins on LDCs that may be relevant for understanding inhalational anthrax physiopathologic mechanisms. These results require further investigation using an in vivo model of inhalational anthrax to determine which cells are involved in spore migration.

Acknowledgments

The authors thank F. Desor for her excellent technical assistance and D. Bois and D. Coulon for their excellent animal care. We also thank M. Mock from the Institut Pasteur, Paris, for providing the *Bacillus anthracis* strains.

References

1. Abrami L, Reig N, van der Goot FG. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. Trends Microbiol **2005**; 13:72–8.
2. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. Science **1998**; 280:734–7.
3. Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci USA **1982**; 79:3162–6.
4. Little SF, Ivins BE. Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. Microbes Infect **1999**; 1:131–9.
5. Mock M, Fouet A. Anthrax. Annu Rev Microbiol **2001**; 55:647–71.
6. Guarner J, Jernigan JA, Shieh WJ, et al. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. Am J Pathol **2003**; 163: 701–9.
7. Ross JM. The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by respiratory route. J Path Bact **1957**; 73:485–93.
8. Vasconcelos D, Barnewall R, Babin M, et al. Pathology of inhalation anthrax in cynomolgus monkeys *(Macaca fascicularis)*. Lab Invest **2003**; 83:1201–9.
9. Guidi-Rontani C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis.* Trends Microbiol **2002**; 10:405–9.
10. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med **2005**; 172:530–51.
11. Cote CK, Rea KM, Norris SL, van Rooijen N, Welkos SL. The use of a model of in vivo macrophage depletion to study the role of macrophages during infection with *Bacillus anthracis* spores. Microb Pathog **2004**; 37:169–75.
12. de Heer HJ, Hammad H, Kool M, Lambrecht BN. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. Semin Immunol **2005**; 17:295–303.
13. Agrawal A, Lingappa J, Leppla SH, et al. Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. Nature **2003**; 424: 329–34.
14. Brittingham KC, Ruthel G, Panchal RG, et al. Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. J Immunol **2005**; 174:5545–52.
15. Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Mathieu J, et al. Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. J Immunol **2005**; 174:4934–41.
16. Alileche A, Serfass ER, Muehlbauer SM, Porcelli SA, Brojatsch J. Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. PLoS Pathog **2005**; 1:e19.
17. Gonzalez-Juarrero M, Orme IM. Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun **2001**; 69:1127–33.
18. von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, et al. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. J Immunol **2005**; 175:1609–18.
19. Vermaelen K, Pauwels R. Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. Cytometry A **2004**; 61:170–7.
20. Osterholzer JJ, Ames T, Polak T, et al. CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen. J Immunol **2005**; 175:874–83.
21. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nat Immunol **2001**; 2:725–31.
22. Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. J Immunol **2003**; 170:4457–64.
23. Pezard C, Berche P, Mock M. Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis.* Infect Immun **1991**; 59:3472–7.
24. Pezard C, Duflot E, Mock M. Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component. J Gen Microbiol **1993**; 139:2459–63.
25. Tournier JN, Hellmann AQ, Lesca G, Jouan A, Drouet E, Mathieu J. Fever-like thermal conditions regulate the activation of maturing dendritic cells. J Leukoc Biol **2003**; 73:493–501.
26. Guidi-Rontani C, Levy M, Ohayon H, Mock M. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. Mol Microbiol **2001**; 42:931–8.
27. Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Labruyere E, Mock M. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. Mol Microbiol **1999**; 31:9–17.
28. Lagranderie M, Nahori MA, Balazuc AM, et al. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. Immunology **2003**; 108:352–64.
29. Gonzalez-Juarrero M, Shim TS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, Orme IM. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. J Immunol **2003**; 171:3128–35.
30. van Rijt LS, Kuipers H, Vos N, Hijdra D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. J Immunol Methods **2004**; 288:111–21.
31. Swanson KA, Zheng Y, Heidler KM, Zhang ZD, Webb TJ, Wilkes DS. Flt3-ligand, IL-4, GM-CSF, and adherence-mediated isolation of murine lung dendritic cells: assessment of isolation technique on phenotype and function. J Immunol **2004**; 173:4875–81.
32. Quinn CP, Dull PM, Semenova V, et al. Immune responses to *Bacillus anthracis* protective antigen in patients with bioterrorism-related cutaneous or inhalation anthrax. J Infect Dis **2004**; 190:1228–36.
33. Banks DJ, Barnajian M, Maldonado-Arocho FJ, Sanchez AM, Bradley KA. Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. Cell Microbiol **2005**; 7:1173–85.
34. Hoover DL, Friedlander AM, Rogers LC, Yoon IK, Warren RL, Cross AS. Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. Infect Immun **1994**; 62:4432–9.
35. Quesnel-Hellmann A, Cleret A, Vidal DR, Tournier JN. Evidence for adjuvanticity of anthrax edema toxin. Vaccine **2006**; 24:699–702.
36. Lavelle EC, McNeela E, Armstrong ME, Leavy O, Higgins SC, Mills KHG. Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. J Immunol **2003**; 171:2384–92.

Discussion - Perspectives

Au cours de ces travaux, nous avons démontré pour la première fois le rôle essentiel joué par les DCpulm myéloïdes dans la physiopathologie du charbon d'inhalation. Les DCpulm myéloïdes constituent le véritable « cheval de Troie » pour les spores de *B. anthracis* à la fois par leur rôle de sentinelle au sein de la muqueuse pulmonaire et par leur forte capacité de phagocytose, mais aussi par leur capacité de migration jusqu'aux ganglions lymphatiques. Le pathogène échappe ainsi à la mise en place des systèmes de défense innée de l'organisme hôte.

Les DCpulm migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques chargées de spores. Ces dernières ont la capacité de germer au sein même des phagolysosomes, comme cela a pu être montré dans les macrophages *in vitro* (Guidi-Rontani *et al.*, 1999 ; Guidi-Rontani *et al.*, 2001 ; Ruthel *et al.*, 2004). Nous avons démontré que les DCpulm sont ensuite sensibles aux toxines sécrétées au cours de l'infection, en absence de phénomène de mort cellulaire. L'inhibition des fonctions des DCpulm favorise la propagation ultérieure du pathogène dans tout l'organisme. En effet, c'est au niveau des ganglions lymphatiques que s'effectue la germination des spores et le passage des formes végétatives dans la circulation sanguine provoquant une septicémie associée à une toxémie conduisant à la mort de l'hôte.

1. *Les DCpulm constituent le « cheval de Troie » des spores de* B. anthracis *dans la forme pulmonaire de la maladie*

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de proposer un nouveau schéma d'infection pulmonaire par les spores de *B. anthracis* (Figure 21).

1.1. Passage de la barrière épithéliale alvéolaire

Le passage de la barrière épithéliale alvéolaire constitue la première étape de diffusion du pathogène. Le dialogue entre les MA et les DCpulm joue probablement un rôle majeur au cours de ce mécanisme.

Après un aérosol de spores, les MA rencontrent les spores inhalées au niveau des alvéoles, puis les phagocytent (Figure 23, 1). Les mécanismes impliqués dans l'adhésion la reconnaissance des spores par les MA ne sont pas encore clairement connus. Une étude sur la structure externe des spores de *B. anthracis* a montré que la glycoprotéine BclA, protéine majoritaire de l'exosporium, joue un rôle dans l'adhésion puisque des souches mutées pour BclA ont des capacités d'adhésion aux macrophages augmentées (Sylvestre, 2003). Des mécanismes de reconnaissance des spores par les MA *via* MyD88 peuvent ensuite intervenir après adhésion et phagocytose, comme cela a été démontré avec des splénocytes murins (Glomski *et al.*, 2007) ou bien, en cas de germination rapide après phagocytose, par reconnaissance de PAMP bactériens *via* un mécanisme TLR2-dépendant (Hughes *et al.*, 2005).

L'activation des MA induit probablement la sécrétion de chimiokines qui vont rapidement recruter les DCpulm avec, dans un premier temps, la création d'extensions trans-épithéliales à travers les alvéoles (Figure 23, 2), puis la migration des DCpulm dans les alvéoles à partir de 6 heures (Figure 23, 4). Ces dernières sont alors capables de phagocyter efficacement les spores par un mécanisme qui reste à déterminer. Il a été montré, chez le rat, que les DCpulm sont capables de produire des extensions trans-épithéliales dans la trachée pour capturer des antigènes (Jahnsen *et al.*, 2006). Une autre étude chez la souris a montré

que la sous-population de α_E-DC présente dans le parenchyme pulmonaire exprime aussi des protéines des jonctions serrées qui lui permettraient de migrer à travers l'épithélium alvéolaire (Sung *et al.*, 2006).

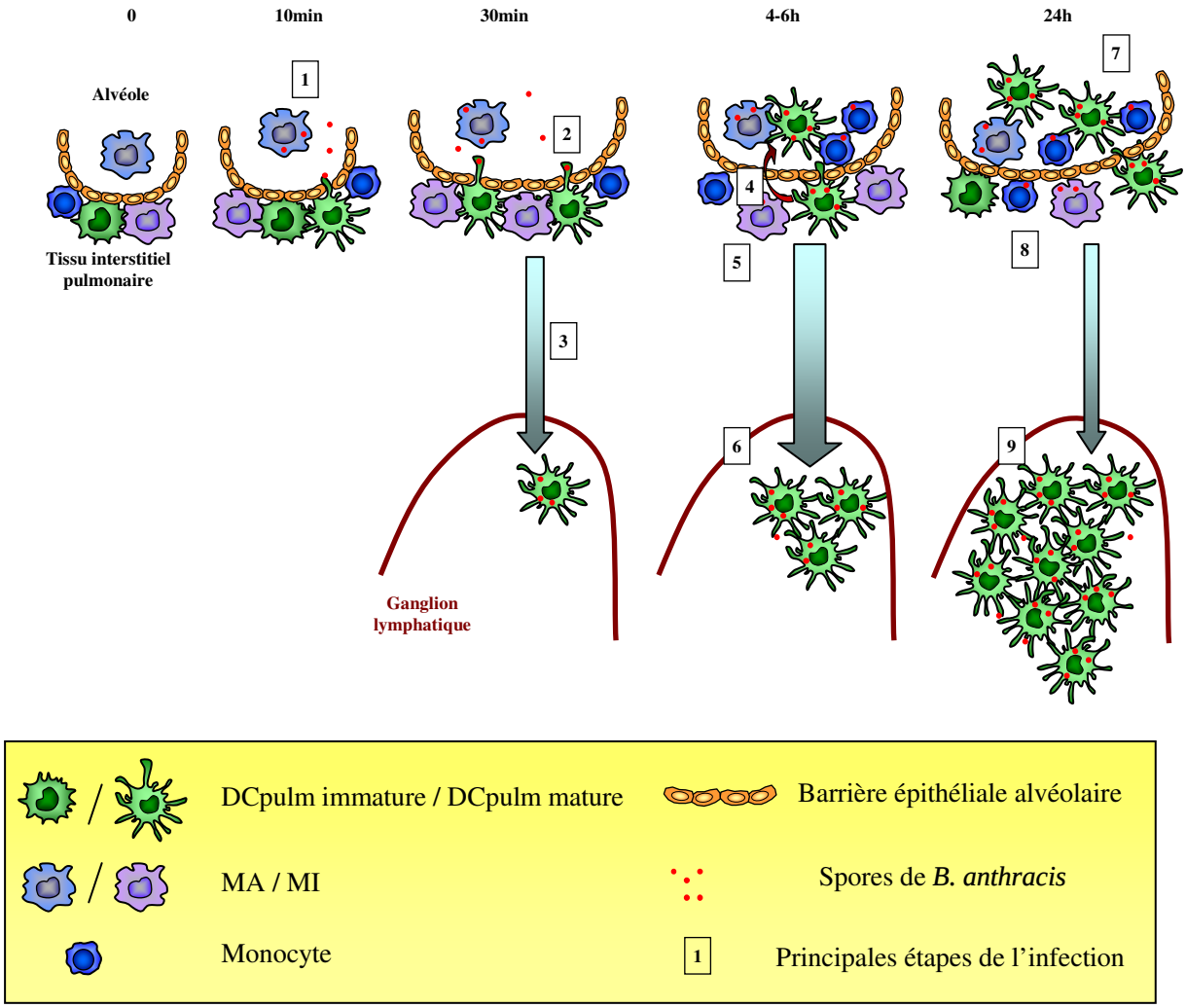


Figure 23 : Modèle récapitulatif de la cinétique d'infection après inhalation de spores de *B. anthracis*. 1) phagocytose des spores par les MA ; 2) phagocytose des spores par les DCpulm avec production d'extensions trans-épithéliales ; 3) premier flux de migration de DCpulm infectées vers les ganglions lymphatiques ; 4) passage de DCpulm et de monocytes vers les alvéoles avec une efficacité élevée de phagocytose des spores par les DCpulm ; 5) déplétion du tissu pulmonaire en DCpulm ; 6) forte migration de DCpulm infectés vers les ganglions lymphatiques ; 7) présence de DCpulm et de monocytes au sein des alvéoles ; 8) repopulation du tissu pulmonaire par les DCpulm ; 9) migration de DCpulm infectés au niveau des ganglions lymphatiques.

Les résultats que nous avons obtenus sont en cohérence avec l'hypothèse que les DCpulm pourraient produire des extensions cytoplasmiques trans-épithéliales dans les alvéoles (Figure 23, 2). En effet, des DCpulm infectées sont observées dans le parenchyme pulmonaire à 30 minutes tandis que nous n'observons aucune DCpulm dans les LBA. Les spores étant immobiles et ne pouvant pas traverser la barrière épithéliale alvéolaire seules, les DCpulm infectées ont probablement échantillonné les espaces alvéolaires grâce à la production d'extensions cytoplasmiques sans qu'il y ait trans-migration de la cellule entière, mécanisme qui serait beaucoup plus lent. Les analyses en microscopie confocale montrent la présence de contacts proches à 10 minutes entre les DCpulm et les spores, sans phagocytose (Figure 23, 1) tandis que des colocalisations sont observées à 30 minutes (Figure 23, 2) et associées à une migration de DCpulm infectées dans les ganglions lymphatiques (Figure 23, 3).

Les signaux moléculaires à l'origine de l'activation des DCpulm restent à déterminer. Toutefois, CX_3CL1, le ligand du récepteur CX_3CR1, pourrait jouer un rôle important, comme cela a pu être montré pour la capture de pathogènes au niveau de l'intestin (Niess *et al.*, 2005). De plus, nos résultats montrent que les DCpulm CX_3CR1-positives participent à la phagocytose et au transport des spores.

1.2. Diffusion du pathogène jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques

Nous avons démontré que lors de la deuxième étape, c'est à dire le transport des spores depuis l'interstitium pulmonaire jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques, les DCpulm myéloïdes jouent un rôle majeur. En effet, les DCpulm constituent la principale population cellulaire infectée dans les ganglions lymphatiques avec un pic de migration 6 heures après inhalation des spores. Les mécanismes impliqués dans la migration des DCpulm jusqu'aux ganglions lymphatiques restent à déterminer. Il est possible que cette migration repose sur un mécanisme CCR7/CCR8-dépendant, comme cela a pu être montré chez la souris, dans un modèle utilisant des billes de latex (Jakubzick *et al.*, 2006). Les spores induisent, sur des DC humaines en culture, une diminution de la transcription de CCR2 et CCR5, les récepteurs aux chimiokines produites au sein des tissus, en association avec une

augmentation de la transcription de CCR7, récepteur aux chimiokines produites au niveau des ganglions lymphatiques (Brittingham *et al.*, 2005).

Les DCpulm constituent donc le « cheval de Troie » des spores de *B. anthracis* au cours des phases précoces de l'infection, tandis que les MA représentent le premier rempart cellulaire.

1.3. Recrutement de DCpulm et de monocytes dans l'espace alvéolaire au cours des phases avancées de l'infection

Six heures après infection par voie i.n., des monocytes et des DCpulm migrent vers les alvéoles pulmonaires (Figure 23, 4). Ces deux populations sont probablement recrutées par des signaux produits par les MA infectés. Il est possible que les DCpulm alors observées dans les alvéoles résultent de la différenciation des monocytes après reconnaissance de DAMP ou de PAMP, ou sous l'action de facteurs de différenciation sécrétés par les MA infectés ou par d'autres cellules ayant détecté la présence de pathogènes dans l'alvéole. Une autre hypothèse sur l'origine des DC alvéolaires est le recrutement de DC ou de précurseurs depuis la circulation sanguine par la sécrétion de chimiokines et/ou de cytokines diffusées depuis le lieu de l'infection.

Ce recrutement de DCpulm et de monocytes constitue le deuxième rempart cellulaire capable de migrer jusqu'aux ganlions lymphatiques (Figure 23, 6 et 9).

2. *Les toxines sécrétées lors de l'infection inhibent les fonctions des DCpulm et des phagocytes pulmonaires*

Lors de ce travail de thèse, nous avons étudié pour la première fois les effets des toxines sécrétées par *B. anthracis* après infection de DCpulm purifiées *ex vivo*. La caractérisation multiparamétrique des DCpulm nous a permis d'observer qu'elles phagocytent plus efficacement les spores que les MA. La quantité de spores présentes dans le phagolysosome est probablement corrélée à la quantité de toxines sécrétées dans ce microenvironnement. Une étude a montré que l'expression des toxines après germination des spores à l'intérieur du phagosome permet au pathogène d'induire la mort des phagocytes (Banks *et al.*, 2005). Cependant nous n'avons pas observé de mort cellulaire après 18 heures d'infection *in vitro*, ainsi, d'autres mécanismes pourraient intervenir pour permettre la libération du pathogène dans le milieu extracellulaire.

2.1. LT inhibe la maturation des DCpulm

Contrairement aux DCMO, les DCpulm sont extrêmement sensibles à LT qui inhibe leur maturation à très faible concentration (1 ng/ml). Cette inhibition de la maturation pourrait mener à une activation et une coordination aberrante de la réponse immune adaptative. La présentation des antigènes, dans ce cas, pourrait aboutir à une anergie des clones T spécifiques ou au développement de cellules Treg.

2.2. Les toxines modifient le profil de sécrétion de cytokines par les phagocytes pulmonaires

Les étapes initiales d'une infection bactérienne sont caractérisées par la sécrétion de cytokines et de chimiokines par différents types cellulaires. Nous avons montré que les

phagocytes pulmonaires sécrètent du TNF-α, de l'IL-6 et de l'IL-10 après infection avec une souche atoxinogène *in vitro*.

La présence de LT inhibe la production de ces cytokines. L'inhibition de TNF-α peut correspondre, *in vivo*, à une dérégulation de la réponse immunitaire spécifique pulmonaire. Le TNF-α est une des premières cytokines libérées lors d'une infection bactérienne. Les macrophages pulmonaires de même que les DCpulm constituent la source principale de TNF-α au sein du tissu pulmonaire et nous avons montré que LT inhibe la sécrétion de TNF-α chez les deux types cellulaires.

L'inhibition de la sécrétion d'IL-6 peut se traduire *in vivo* par une inhibition de la prolifération des cellules T, une inhibition de l'activation des cellules NK et de la production d'Ig par les cellules B. De plus, l'IL-6 joue un rôle prédominant dans l'établissement des réponses immunitaires induites par les DC et inhibe l'induction des Treg (Figure 20). Ainsi, la sécrétion de LT par le pathogène permet à ce dernier d'échapper à la mise en place d'une réponse adaptative.

LT inhibe aussi la sécrétion d'IL-10. *In vivo*, l'IL-10 diminue l'expression des molécules du CMH II et de co-stimulation, diminuant la capacité de présentation de l'Ag par les CPA (Ding *et al.*, 1993). D'autres études ont démontré que l'IL-10 avait un effet protecteur sur les MA en diminuant leur apoptose (Bingisser et Holt, 2001). De plus, l'IL-10 diminue la synthèse de protéines pro-inflammatoires, en particulier celle d'IL-12.

Nous observons des taux élevés d'IL-6 et d'IL-10 après infection des phagocytes pulmonaires avec des souches sécrétant ET ou après incubation avec ET purifiée. Une autre étude, sur des monocytes humains stimulés par du LPS, montre que ET induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Hoover *et al.*, 1994). L'augmentation de la sécrétion de ces cytokines favorise probablement le développement d'une réponse immune Th2 ou Treg *in vivo*. En effet, il a été montré que la sécrétion d'IL-6 par les DCpulm polarise les cellules T vers une réponse Th2 (Dodge *et al.*, 2003) tandis que la sécrétion d'IL-10 induit un état de tolérance (Akbari *et al.*, 2001). Une autre étude au sein du laboratoire a montré que ET a un effet adjuvant sur la réponse anti-PA et sur la réponse humorale chez la souris (voir Annexe II, (Quesnel-Hellmann *et al.*, 2006)). Cet effet adjuvant pourrait être lié à un shift de la réponse vers une réponse Th2.

Les toxines sécrétées par *B. anthracis* ont donc des effets distincts sur les phagocytes pulmonaires et nous observons, après incubation des cellules avec une souche sécrétant les deux toxines ou avec les toxines purifiées, que les effets de LT dominent les effets de ET à la fois sur la sécrétion de cytokines mais aussi sur la maturation des DCpulm.

3. Perspectives

Ce travail de thèse ouvre de nombreuses perspectives sur l'étude des phases précoces de l'infection pulmonaire par les spores de *B. anthracis*.

Les spores de *B. anthracis* sont inertes et immobiles. Pourtant, la forme pulmonaire de la maladie du charbon ne présente aucune lésion du tissu pulmonaire au cours des phases précoces de l'infection. Nous avons montré que les spores utilisent les DCpulm comme « cheval de Troie » pour traverser la barrière alvéolo-capillaire et atteindre les ganglions lymphatiques. Au niveau de l'intestin, les DC exprimant le récepteur CX_3CR1 sont capables d'émettre des extensions cytoplasmique à travers la barrière épithéliale sans l'endommager pour échantillonner la lumière intestinale et capturer les éléments présents (Niess *et al.*, 2005 ; Vallon-Eberhard *et al.*, 2006). Au niveau du système respiratoire, les DCpulm sont localisées sous l'épithélium alvéolaire (Holt *et al.*, 1993) et une étude récente a montré que la sous-population pulmonaire αE-DC exprime des protéines impliquées dans les jonctions serrées telles que Claudine-1, Claudine-7 et ZO-2 (Sung *et al.*, 2006). Nous avons montré que les DCpulm CX_3CR1 participent à la capture et au transport des spores jusqu'aux ganglions lymphatiques. Ainsi, l'étude de l'expression de l'intégrine αE-β7 ou de protéines des jonctions serrées par cette sous-population de DCpulm CX_3CR1^+ favoriserait l'hypothèse de la production d'extensions cytoplasmiques à travers la barrière épithéliale, mécanisme permettant la phagocytose des spores présentes dans les alvéoles sans endommager la paroi alvéolaire.

Le dialogue entre les DCpulm et les MA joue probablement un rôle important dans la mise en place des mécanismes de capture des spores. Nous avons montré que les MA sont les premières cellules infectées après inhalation de spores. Il est possible que les MA produisent

différentes cytokines et/ou chimiokines telles que CX_3CL1 qui pourrait activer la formation d'extensions trans-épithéliales par les DCpulm. Une étude de la migration des DCpulm vers un compartiment de MA infectés en chambre de migration permettrait de conclure sur l'effet chimioattractant des MA infectés. De plus, plusieurs travaux ont démontré l'effet inhibiteur des MA sur les DCpulm (Thepen *et al.*, 1989 ; Jakubzick *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant d'observer les fonctions des DCpulm après infection avec des spores de *B. anthracis*, en absence de MA. Plusieurs modèles d'études sont envisagés tels que la déplétion des MA par instillation nasale de clodronate, ou encore la déplétion conditionnelle des cellules $CD11c^+$ par la toxine diphtérique dans un modèle de souris transgéniques CD11c-DTR. Ce modèle permet la déplétion spécifique des cellules $CD11c^+$ du compartiment pulmonaire par instillation i.t. de la toxine diphtérique (Landsman *et al.*, 2007).

Nos résultats ouvrent aussi des perspectives d'études sur les phases plus avancées de l'infection. Ainsi, la caractérisation des DCpulm recrutées dans les alvéoles 6 heures après infection paraît essentielle car elles sont à l'origine d'un deuxième transport de spores jusqu'aux ganglions lymphatiques. Il pourrait s'agir de DCpulm résidentes traversant la barrière alvéolaire sans l'endommager (impliquant des mécanismes proches de ceux décrits précédemment). Il pourrait aussi s'agir de précurseurs présents dans le parenchyme pulmonaire et traversant la barrière alvéolo-épithéliale sous l'action de chimiokines et/ou cytokines sécrétées au sein de l'alvéole. Ces précurseurs se différencieraient en DCpulm sous l'influence de facteurs de différenciation présents au sein de l'alvéole, ce qui pourrait expliquer la présence des monocytes dans les alvéoles à cette phase de l'infection (Landsman *et al.*, 2007). Enfin, l'hypothèse de DC ou de précurseurs recrutés depuis la circulation sanguine ne peut être écartée. Le modèle de souris $CX_3CR1^{+/gfp}$ permet de visualiser les DCpulm et leur principal précurseur, les monocytes, *in vivo* sans marquage complémentaire. Des expériences de transferts adoptifs permettront d'apporter de nouveaux éléments sur l'origine des cellules recrutées dans les alvéoles, 6 heures après l'infection.

L'implication des toxines dans le processus de propagation du pathogène n'est pas clairement identifiée. Il est difficile de savoir si la phagocytose seule induit la migration des cellules ou si les spores germent dès leur entrée dans la cellule hôte et dérégulent les fonctions cellulaires très tôt dans le processus infectieux. Des études *in vitro* sur des DC dérivées de monocytes humains tendent à montrer des effets spécifiques pour chacune des toxines sur la migration cellulaire (Quesnel-Hellman, communication personnelle). L'étude de l'infection *in*

vivo avec différentes souches exprimant une seule des deux toxines ou avec une souche capsulée et atoxinogène apportera de nouveaux éléments quant aux rôles des toxines au cours de l'infection.

Les résultats apportés par ce travail de thèse montrent la rapidité de l'infection pulmonaire par B. anthracis. Nos résultats montrent que les spores diffusent très rapidement et que les voies respiratoires inférieures sont infectées dès 30 minutes après exposition. D'un point de vue thérapeutique, nos résultats permettent d'écarter l'intérêt d'un traitement local et démontrent la nécessité d'administrer très rapidement un traitement systémique.

Références Bibliographiques

Références

Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., and van der Goot, F. G. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. J Cell Biol *160*, 321-328.

Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R. G., Leppla, S. H., and van der Goot, F. G. (2004). Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. J Cell Biol *166*, 645-651.

Abrami, L., Reig, N., and van der Goot, F. G. (2005). Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. Trends Microbiol *13*, 72-78.

Abramova, F. A., Grinberg, L. M., Yampolskaya, O. V., and Walker, D. H. (1993). Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 2291-2294.

AFSSAPS (2005). Charbon, thérapeutique. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé http://agmed.sante.gouv.fr.

Agrawal, A., Lingappa, J., Leppla, S. H., Agrawal, S., Jabbar, A., Quinn, C., and Pulendran, B. (2003). Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. Nature *424*, 329-334.

Akbari, O., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nat Immunol *2*, 725-731.

Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2003). Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma. Int Arch Allergy Immunol *130*, 108-118.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol *4*, 499-511.

Alam, S., Gupta, M., and Bhatnagar, R. (2006). Inhibition of platelet aggregation by anthrax edema toxin. Biochem Biophys Res Commun *339*, 107-114.

Albert, M. L. (2004). Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? Nat Rev Immunol *4*, 223-231.

Albrink, W. S., and Goodlow, R. J. (1959). Experimental inhalation anthrax in the chimpanzee. Am J Pathol *35*, 1055-1065.

Albrink, W. S., Brooks, S. M., Biron, R. E., and Kopel, M. (1960). Human inhalation anthrax. A report of three fatal cases. Am J Pathol *36*, 457-471.

Alileche, A., Serfass, E. R., Muehlbauer, S. M., Porcelli, S. A., and Brojatsch, J. (2005). Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. PLoS Pathog *1*, e19.

Aloni-Grinstein, R., Gat, O., Altboum, Z., Velan, B., Cohen, S., and Shafferman, A. (2005). Oral spore vaccine based on live attenuated nontoxinogenic *Bacillus anthracis* expressing recombinant mutant protective antigen. Infect Immun *73*, 4043-4053.

Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N., and Ardavin, C. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. Blood *93*, 590-598.

Ardavin, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. Nat Rev Immunol *3*, 582-590.

Arora, N., and Leppla, S. H. (1993). Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. J Biol Chem *268*, 3334-3341.

Ashiuchi, M., Nawa, C., Kamei, T., Song, J. J., Hong, S. P., Sung, M. H., Soda, K., and Misono, H. (2001). Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. Eur J Biochem *268*, 5321-5328.

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. Nat Immunol *2*, 1144-1150.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J. J., Briere, F., and Trinchieri, G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. J Immunol *171*, 6466-6477.

Baldari, C. T., Tonello, F., Paccani, S. R., and Montecucco, C. (2006). Anthrax toxins: a paradigm of bacterial immune suppression. Trends Immunol.

Banks, D. J., Barnajian, M., Maldonado-Arocho, F. J., Sanchez, A. M., and Bradley, K. A. (2005). Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. Cell Microbiol *7*, 1173-1185.

Banks, D. J., Ward, S. C., and Bradley, K. A. (2006). New insights into the functions of anthrax toxin. Expert Rev Mol Med *8*, 1-18.

Barakat, L. A., Quentzel, H. L., Jernigan, J. A., Kirschke, D. L., Griffith, K., Spear, S. M.,

Kelley, K., Barden, D., Mayo, D., Stephens, D. S., *et al.* (2002). Fatal inhalational anthrax in a 94-year-old Connecticut woman. Jama *287*, 863-868.

Barnes, J. M. (1947). The development of anthrax following the administration of spores by inhalation. Brit J Exptl Pathol *28*, 385-394.

Bartlett, J. G., Inglesby, T. V., Jr., and Borio, L. (2002). Management of anthrax. Clin Infect Dis *35*, 851-858.

Beall, F. A., Taylor, M. J., and Thorne, C. B. (1962). Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. J Bacteriol *83*, 1274-1280.

Belz, G. T., Smith, C. M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2004). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 8670-8675.

Bingisser, R. M., Tilbrook, P. A., Holt, P. G., and Kees, U. R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. J Immunol *160*, 5729-5734.

Bingisser, R. M., and Holt, P. G. (2001). Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. Swiss Med Wkly *131*, 171-179.

Bishop, A. E. (2004). Pulmonary epithelial stem cells. Cell Prolif *37*, 89-96.

Bonuccelli, G., Sotgia, F., Frank, P. G., Williams, T. M., de Almeida, C. J., Tanowitz, H. B., Scherer, P. E., Hotchkiss, K. A., Terman, B. I., Rollman, B., *et al.* (2005). ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining *Bacillus anthracis*' three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. Am J Physiol Cell Physiol *288*, C1402-1410.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. J Exp Med *197*, 101-109.

Borio, L., Frank, D., Mani, V., Chiriboga, C., Pollanen, M., Ripple, M., Ali, S., DiAngelo, C., Lee, J., Arden, J., *et al.* (2001). Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients. Jama *286*, 2554-2559.

Boyden, E. D., and Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. Nat Genet *38*, 240-244.

Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., and Romani, L. (2002). Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. J Immunol *168*, 1362-1371.

Brachman, P. S. (1961). Discussions of Papers on Bacterial Diseases. Bacteriol Rev *25*, 282-284.

Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J., and Young, J. A. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature *414*, 225-229.

Bradley, K. A., and Young, J. A. (2003). Anthrax toxin receptor proteins. Biochem Pharmacol *65*, 309-314.

Bragg, T. S., and Robertson, D. L. (1989). Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. Gene *81*, 45-54.

Brimnes, M. K., Bonifaz, L., Steinman, R. M., and Moran, T. M. (2003). Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. J Exp Med *198*, 133-144.

Brinker, K. G., Martin, E., Borron, P., Mostaghel, E., Doyle, C., Harding, C. V., and Wright, J. R. (2001). Surfactant protein D enhances bacterial antigen presentation by bone marrow-derived dendritic cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *281*, L1453-1463.

Brittingham, K. C., Ruthel, G., Panchal, R. G., Fuller, C. L., Ribot, W. J., Hoover, T. A., Young, H. A., Anderson, A. O., and Bavari, S. (2005). Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. J Immunol *174*, 5545-5552.

Brossier, F., and Mock, M. (2001). Toxins of *Bacillus anthracis*. Toxicon *39*, 1747-1755.

Brossier, F., Levy, M., and Mock, M. (2002). Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. Infect Immun *70*, 661-664.

Brossier, F., Levy, M., Landier, A., Lafaye, P., and Mock, M. (2004). Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. Infect Immun *72*, 6313-6317.

Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F. R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., Greenfield, E. A., and Freeman, G. J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. J Immunol *170*, 1257-1266.

Buechner, H. (1888). Untersuchungen über den Durchtritt von Infection serregern durch die Intacte Lungenoberflache. J Hyg (Berlin) *8*, 145-245.

Burnett, J. C., Henchal, E. A., Schmaljohn, A. L., and Bavari, S. (2005). The evolving field of

biodefence: therapeutic developments and diagnostics. Nat Rev Drug Discov *4*, 281-297.
Bush, L. M., Abrams, B. H., Beall, A., and Johnson, C. C. (2001). Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States. N Engl J Med *345*, 1607-1610.
Candela, T., and Fouet, A. (2005). *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. Mol Microbiol *57*, 717-726.
Candela, T., Mock, M., and Fouet, A. (2005). CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. J Bacteriol *187*, 7765-7772.
Candela, T., and Fouet, A. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. Mol Microbiol *60*, 1091-1098.
Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature *360*, 258-261.
Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. Blood *90*, 1458-1470.
CDC (2002). From the Centers for Disease Control and Prevention. Additional options for preventive treatment for exposed persons to inhalational anthrax. Jama *287*, 579.
Chabot, D. J., Scorpio, A., Tobery, S. A., Little, S. F., Norris, S. L., and Friedlander, A. M. (2004). Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. Vaccine *23*, 43-47.
Chamberland, C. (1883). Le charbon et la vaccination charbonneuse. (Paris, Bernard Tignol).
Chopra, A. P., Boone, S. A., Liang, X., and Duesbery, N. S. (2003). Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. J Biol Chem *278*, 9402-9406.
Claus, D., and Berkeley, R. C. W. (1980). *Genus Bacillus* Cohn 1872. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1105-1139.
Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., and Nicod, L. P. (1999). Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. Am J Respir Cell Mol Biol *21*, 547-554.
Cohen, S., Mendelson, I., Altboum, Z., Kobiler, D., Elhanany, E., Bino, T., Leitner, M., Inbar, I., Rosenberg, H., Gozes, Y.*, et al.* (2000). Attenuated nontoxinogenic and nonencapsulated recombinant *Bacillus anthracis* spore vaccines protect against anthrax. Infect Immun *68*, 4549-4558.
Cole, A. M., and Waring, A. J. (2002). The role of defensins in lung biology and therapy. Am J Respir Med *1*, 249-259.
Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol *5*, 1219-1226.
Comer, J. E., Chopra, A. K., Peterson, J. W., and Konig, R. (2005a). Direct inhibition of T-lymphocyte activation by anthrax toxins in vivo. Infect Immun *73*, 8275-8281.
Comer, J. E., Galindo, C. L., Chopra, A. K., and Peterson, J. W. (2005b). GeneChip analyses of global transcriptional responses of murine macrophages to the lethal toxin of *Bacillus anthracis*. Infect Immun *73*, 1879-1885.
Cote, C. K., Rea, K. M., Norris, S. L., van Rooijen, N., and Welkos, S. L. (2004). The use of a model of in vivo macrophage depletion to study the role of macrophages during infection with *Bacillus anthracis* spores. Microb Pathog *37*, 169-175.
Cote, C. K., Van Rooijen, N., and Welkos, S. L. (2006). Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. Infect Immun *74*, 469-480.
Crawford, M. A., Aylott, C. V., Bourdeau, R. W., and Bokoch, G. M. (2006). *Bacillus anthracis* toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. J Immunol *176*, 7557-7565.
Cui, X., Moayeri, M., Li, Y., Li, X., Haley, M., Fitz, Y., Correa-Araujo, R., Banks, S. M., Leppla, S. H., and Eichacker, P. Q. (2004). Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *286*, R699-709.
Dahl, M. E., Dabbagh, K., Liggitt, D., Kim, S., and Lewis, D. B. (2004). Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. Nat Immunol *5*, 337-343.
Dakic, A., and Wu, L. (2003). Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. Leuk Lymphoma *44*, 1469-1475.
Dal Molin, F., Tonello, F., Ladant, D., Zornetta, I., Zamparo, I., Di Benedetto, G., Zaccolo, M., and Montecucco, C. (2006). Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. Embo J *25*, 5405-5413.
Dang, O., Navarro, L., Anderson, K., and David, M. (2004). Cutting edge: anthrax lethal toxin inhibits activation of IFN-regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. J Immunol *172*, 747-751.
Davaine, C. (1863). Recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de « sang de rate ». CRAcadSci *LVII*.

de Heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. J Exp Med *200*, 89-98.

de Heer, H. J., Hammad, H., Kool, M., and Lambrecht, B. N. (2005). Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. Semin Immunol *17*, 295-303.

Delclaux, C., and Azoulay, E. (2003). Inflammatory response to infectious pulmonary injury. Eur Respir J Suppl *42*, 10s-14s.

Demedts, I. K., Brusselle, G. G., Vermaelen, K. Y., and Pauwels, R. A. (2005). Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. Am J Respir Cell Mol Biol *32*, 177-184.

Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science *303*, 1529-1531.

Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N., and Shevach, E. M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J Immunol *151*, 1224-1234.

Dirckx, J. H. (1981). Virgil on anthrax. Am J Dermatopathol *3*, 191-195.

Dixon, T. C., Meselson, M., Guillemin, J., and Hanna, P. C. (1999). Anthrax. N Engl J Med *341*, 815-826.

Dobbs, L. G., Gonzalez, R., Matthay, M. A., Carter, E. P., Allen, L., and Verkman, A. S. (1998). Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 2991-2996.

Dodge, I. L., Carr, M. W., Cernadas, M., and Brenner, M. B. (2003). IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. J Immunol *170*, 4457-4464.

Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2002). MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol *20*, 55-72.

Doolan, D. L., Freilich, D. A., Brice, G. T., Burgess, T. H., Berzins, M. P., Bull, R. L., Graber, N. L., Dabbs, J. L., Shatney, L. L., Blazes, D. L.*, et al.* (2007). The US capitol bioterrorism anthrax exposures: clinical epidemiological and immunological characteristics. J Infect Dis *195*, 174-184.

Drum, C. L., Yan, S. Z., Bard, J., Shen, Y. Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., and Tang, W. J. (2002). Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. Nature *415*, 396-402.

Drysdale, M., Heninger, S., Hutt, J., Chen, Y., Lyons, C. R., and Koehler, T. M. (2005). Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. Embo J *24*, 221-227.

Duesbery, N. S., Webb, C. P., Leppla, S. H., Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Copeland, T. D., Ahn, N. G., Oskarsson, M. K., Fukasawa, K., Paull, K. D., and Vande Woude, G. F. (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. Science *280*, 734-737.

During, R. L., Li, W., Hao, B., Koenig, J. M., Stephens, D. S., Quinn, C. P., and Southwick, F. S. (2005). Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility. J Infect Dis *192*, 837-845.

Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. J Exp Med *196*, 1645-1651.

Enstone, J. E., Wale, M. C., Nguyen-Van-Tam, J. S., and Pearson, J. C. (2003). Adverse medical events in British service personnel following anthrax vaccination. Vaccine *21*, 1348-1354.

Erwin, J. L., DaSilva, L. M., Bavari, S., Little, S. F., Friedlander, A. M., and Chanh, T. C. (2001). Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to *Bacillus anthracis* lethal toxin. Infect Immun *69*, 1175-1177.

Escuyer, V., Duflot, E., Sezer, O., Danchin, A., and Mock, M. (1988). Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. Gene *71*, 293-298.

Eveland, S. S., Pompliano, D. L., and Anderson, M. S. (1997). Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and folyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. Biochemistry *36*, 6223-6229.

Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S., and Groner, Y. (2004). Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. Embo J *23*, 969-979.

Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. J Immunol *173*, 3748-3754.

Fang, H., Cordoba-Rodriguez, R., Lankford, C. S., and Frucht, D. M. (2005). Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2

production in CD4+ T cells. J Immunol *174*, 4966-4971.

Fang, H., Xu, L., Chen, T. Y., Cyr, J. M., and Frucht, D. M. (2006). Anthrax lethal toxin has direct and potent inhibitory effects on B cell proliferation and immunoglobulin production. J Immunol *176*, 6155-6161.

Fellows, P. F., Linscott, M. K., Ivins, B. E., Pitt, M. L., Rossi, C. A., Gibbs, P. H., and Friedlander, A. M. (2001). Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. Vaccine *19*, 3241-3247.

Firoved, A. M., Miller, G. F., Moayeri, M., Kakkar, R., Shen, Y., Wiggins, J. F., McNally, E. M., Tang, W. J., and Leppla, S. H. (2005). *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. Am J Pathol *167*, 1309-1320.

Flick-Smith, H. C., Walker, N. J., Gibson, P., Bullifent, H., Hayward, S., Miller, J., Titball, R. W., and Williamson, E. D. (2002). A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. Infect Immun *70*, 1653-1656.

Fossum, S. (1989). Dendritic leukocytes: features of their in vivo physiology. Res Immunol *140*, 883-891; discussion 918-826.

Fouet, A., and Mock, M. (1996). Differential influence of the two *Bacillus anthracis* plasmids on regulation of virulence gene expression. Infect Immun *64*, 4928-4932.

Fouet, A., and Mock, M. (2006). Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. Curr Opin Microbiol *9*, 1-7.

Franke-Ullmann, G., Pfortner, C., Walter, P., Steinmuller, C., Lohmann-Matthes, M. L., and Kobzik, L. (1996). Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. J Immunol *157*, 3097-3104.

Friedlander, A. M. (1986). Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. J Biol Chem *261*, 7123-7126.

Friedlander, A. M., Bhatnagar, R., Leppla, S. H., Johnson, L., and Singh, Y. (1993). Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. Infect Immun *61*, 245-252.

Friedlander, A. M., Welkos, S. L., and Ivins, B. E. (2002). Anthrax vaccines. Curr Top Microbiol Immunol *271*, 33-60.

Fritz, D. L., Jaax, N. K., Lawrence, W. B., Davis, K. J., Pitt, M. L., Ezzell, J. W., and Friedlander, A. M. (1995). Pathology of experimental inhalation anthrax in the rhesus monkey. Lab Invest *73*, 691-702.

Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., and Girardin, S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nat Immunol *7*, 1250-1257.

Gallucci, S., and Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. Curr Opin Immunol *13*, 114-119.

Germain, R. N. (2004). An innately interesting decade of research in immunology. Nat Med *10*, 1307-1320.

Ghossain, A. (2006). Images in clinical medicine. Anthrax of the cecum. N Engl J Med *355*, 940.

Gimenez, A. P., Wu, Y. Z., Paya, M., Delclaux, C., Touqui, L., and Goossens, P. L. (2004). High bactericidal efficiency of type IIa phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. J Immunol *173*, 521-530.

Gladstone, G. P. (1946). Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. Br J Exp Pathol *27*, 394-418.

Glomski, I. J., Fritz, J. H., Keppler, S. J., Balloy, V., Chignard, M., Mock, M., and Goossens, P. L. (2007). Murine splenocytes produce inflammatory cytokines in a MyD88-dependent response to *Bacillus anthracis* spores. Cell Microbiol *9*, 502-513.

Gonzalez-Juarrero, M., and Orme, I. M. (2001). Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun *69*, 1127-1133.

Gonzalez-Juarrero, M., Shim, T. S., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A. P., and Orme, I. M. (2003). Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. J Immunol *171*, 3128-3135.

Goodman, J. W., and Nitecki, D. E. (1967). Studies on the relation of a prior immune response to immunogenicity. Immunology *13*, 577-583.

Gordon, S. B., and Read, R. C. (2002). Macrophage defences against respiratory tract infections. Br Med Bull *61*, 45-61.

Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol *5*, 953-964.

Greenberger, M. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Danforth, J. M., Laichalk, L. L., McGillicuddy, D. C., and Standiford, T. J. (1996). Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumonia*. J Infect Dis *173*, 159-165.

Grinberg, L. M., Abramova, F. A., Yampolskaya, O. V., Walker, D. H., and Smith, J. H. (2001). Quantitative pathology of inhalational anthrax I: quantitative microscopic findings. Mod Pathol *14*, 482-495.

Guarner, J., Jernigan, J. A., Shieh, W. J., Tatti, K., Flannagan, L. M., Stephens, D. S., Popovic, T., Ashford, D. A., Perkins, B. A., and Zaki, S. R.

(2003). Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. Am J Pathol *163*, 701-709.

Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Labruyere, E., and Mock, M. (1999). Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. Mol Microbiol *31*, 9-17.

Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Mock, M., and Cabiaux, V. (2000). Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. Cell Microbiol *2*, 259-264.

Guidi-Rontani, C., Levy, M., Ohayon, H., and Mock, M. (2001). Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. Mol Microbiol *42*, 931-938.

Guidi-Rontani, C. (2002). The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. Trends Microbiol *10*, 405-409.

Gunn, M. D., Nelken, N. A., Liao, X., and Williams, L. T. (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. J Immunol *158*, 376-383.

Hambleton, P., Carman, J. A., and Melling, J. (1984). Anthrax: the disease in relation to vaccines. Vaccine *2*, 125-132.

Hambleton, P., and Turnbull, P. C. (1990). Anthrax vaccine development: a continuing story. Adv Biotechnol Processes *13*, 105-122.

Hamilton, J. A. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity. Trends Immunol *23*, 403-408.

Hammad, H., de Heer, H. J., Soullie, T., Hoogsteden, H. C., Trottein, F., and Lambrecht, B. N. (2003). Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. J Immunol *171*, 3936-3940.

Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2006). Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. J Allergy Clin Immunol *118*, 331-336.

Hanby, W. E., and Rydon, H. N. (1946). The capsular substance of *Bacillus anthracis*. Biochem J *40*, 297-307.

Havenith, C. E., van Haarst, J. M., Breedijk, A. J., Betjes, M. G., Hoogsteden, H. C., Beelen, R. H., and Hoefsmit, E. C. (1994). Enrichment and characterization of dendritic cells from human bronchoalveolar lavages. Clin Exp Immunol *96*, 339-343.

Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D. H., Carson, D. A., and Raz, E. (2004). Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. J Clin Invest *114*, 270-279.

Henderson, D. W., Peacock, S., and Belton, F. C. (1956). Observations on the prophylaxis of experimental pulmonary anthrax in the monkey. J Hyg (Lond) *54*, 28-36.

Heninger, S., Drysdale, M., Lovchik, J., Hutt, J., Lipscomb, M. F., Koehler, T. M., and Lyons, C. R. (2006). Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. Infect Immun *74*, 6067-6074.

Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. J Immunol *167*, 741-748.

Henson, P. M., Bratton, D. L., and Fadok, V. A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 627-633.

Holt, P. G. (1978). Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. Am Rev Respir Dis *118*, 791-793.

Holt, P. G., Degebrodt, A., O'Leary, C., Krska, K., and Plozza, T. (1985). T cell activation by antigen-presenting cells from lung tissue digests: suppression by endogenous macrophages. Clin Exp Immunol *62*, 586-593.

Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. A., and Oliver, J. (1988). MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. J Exp Med *167*, 262-274.

Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. A., Oliver, J., Holt, B. J., and McMenamin, P. G. (1990). A contiguous network of dendritic antigen-presenting cells within the respiratory epithelium. Int Arch Allergy Appl Immunol *91*, 155-159.

Holt, P. G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P. G., Kraal, G., and Thepen, T. (1993). Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. J Exp Med *177*, 397-407.

Holt, P. G., Haining, S., Nelson, D. J., and Sedgwick, J. D. (1994). Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. J Immunol *153*, 256-261.

Hong, J., Beeler, J., Zhukovskaya, N. L., He, W., Tang, W. J., and Rosner, M. R. (2005). Anthrax edema factor potency depends on mode of cell entry. Biochem Biophys Res Commun *335*, 850-857.

Hoover, D. L., Friedlander, A. M., Rogers, L. C., Yoon, I. K., Warren, R. L., and Cross, A. S.

(1994). Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. Infect Immun *62*, 4432-4439.

Hsu, L. C., Park, J. M., Zhang, K., Luo, J. L., Maeda, S., Kaufman, R. J., Eckmann, L., Guiney, D. G., and Karin, M. (2004). The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. Nature *428*, 341-345.

Hughes, M. A., Green, C. S., Lowchyj, L., Lee, G. M., Grippe, V. K., Smith, M. F., Jr., Huang, L. Y., Harvill, E. T., and Merkel, T. J. (2005). MyD88-dependent signaling contributes to protection following *Bacillus anthracis* spore challenge of mice: implications for Toll-like receptor signaling. Infect Immun *73*, 7535-7540.

Iles, K. E., and Forman, H. J. (2002). Macrophage signaling and respiratory burst. Immunol Res *26*, 95-105.

Inglesby, T. V., O'Toole, T., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Friedlander, A. M., Gerberding, J., Hauer, J., Hughes, J.*, et al.* (2002). Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. Jama *287*, 2236-2252.

Ivins, B. E., Pitt, M. L., Fellows, P. F., Farchaus, J. W., Benner, G. E., Waag, D. M., Little, S. F., Anderson, G. W., Jr., Gibbs, P. H., and Friedlander, A. M. (1998). Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. Vaccine *16*, 1141-1148.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol *5*, 987-995.

Jahnsen, F. L., Strickland, D. H., Thomas, J. A., Tobagus, I. T., Napoli, S., Zosky, G. R., Turner, D. J., Sly, P. D., Stumbles, P. A., and Holt, P. G. (2006). Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. J Immunol *177*, 5861-5867.

Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., van Rooijen, N., and Randolph, G. J. (2006). Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. J Immunol *176*, 3578-3584.

Jansen, J. H., Wientjens, G. J., Fibbe, W. E., Willemze, R., and Kluin-Nelemans, H. C. (1989). Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. J Exp Med *170*, 577-582.

Jeffery, P. K. (1983). Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. Am Rev Respir Dis *128*, S14-20.

Jernigan, J. A., Stephens, D. S., Ashford, D. A., Omenaca, C., Topiel, M. S., Galbraith, M., Tapper, M., Fisk, T. L., Zaki, S., Popovic, T.*, et al.* (2001). Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. Emerg Infect Dis *7*, 933-944.

Joyce, J., Cook, J., Chabot, D., Hepler, R., Shoop, W., Xu, Q., Stambaugh, T., Aste-Amezaga, M., Wang, S., Indrawati, L.*, et al.* (2006). Immunogenicity and protective efficacy of *Bacillus anthracis* poly-gamma-D-glutamic acid capsule covalently coupled to a protein carrier using a novel triazine-based conjugation strategy. J Biol Chem *281*, 4831-4843.

Julia, V., Hessel, E. M., Malherbe, L., Glaichenhaus, N., O'Garra, A., and Coffman, R. L. (2002). A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. Immunity *16*, 271-283.

Kaiserlian, D., Cerf-Bensussan, N., and Hosmalin, A. (2005). The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. J Leukoc Biol *78*, 311-318.

Kassam, A., Der, S. D., and Mogridge, J. (2005). Differentiation of human monocytic cell lines confers susceptibility to *Bacillus anthracis* lethal toxin. Cell Microbiol *7*, 281-292.

Kau, J. H., Sun, D. S., Tsai, W. J., Shyu, H. F., Huang, H. H., Lin, H. C., and Chang, H. H. (2005). Antiplatelet activities of anthrax lethal toxin are associated with suppressed p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in the platelets. J Infect Dis *192*, 1465-1474.

Kaufmann, A. F., and Dannenberg, A. L. (2002). Age as a risk factor for cutaneous human anthrax: evidence from Haiti, 1973-1974. Emerg Infect Dis *8*, 874-875.

Kelley, J. (1990). Cytokines of the lung. Am Rev Respir Dis *141*, 765-788.

Keppie, J., Smith, H., and Harris-Smith, P. W. (1955). The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. III. The role of the terminal bacteraemia in death of guinea-pigs from anthrax. Br J Exp Pathol *36*, 315-322.

Kim, S. O., Jing, Q., Hoebe, K., Beutler, B., Duesbery, N. S., and Han, J. (2003). Sensitizing anthrax lethal toxin-resistant macrophages to lethal toxin-induced killing by tumor necrosis factor-alpha. J Biol Chem *278*, 7413-7421.

Kirby, J. E. (2004). Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. Infect Immun *72*, 430-439.

Kiyono, H., and Fukuyama, S. (2004). NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. Nat Rev Immunol *4*, 699-710.

Klesney-Tait, J., Turnbull, I. R., and Colonna, M. (2006). The TREM receptor family and signal integration. Nat Immunol *7*, 1266-1273.

Klimpel, K. R., Molloy, S. S., Thomas, G., and Leppla, S. H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic

properties of furin. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 10277-10281.

Klimpel, K. R., Arora, N., and Leppla, S. H. (1994). Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. Mol Microbiol *13*, 1093-1100.

Knapp, S., Leemans, J. C., Florquin, S., Branger, J., Maris, N. A., Pater, J., van Rooijen, N., and van der Poll, T. (2003). Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. Am J Respir Crit Care Med *167*, 171-179.

Koch, R. (1876). Untersuchungen über Bakterien. V. Die Etiologie der Milzbran-Krankheit gegründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. . Beitr Biol Pflanz *2*, 277-310.

Kochi, S. K., Schiavo, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1994). Zinc content of the *Bacillus anthracis* lethal factor. FEMS Microbiol Lett *124*, 343-348.

Kolbe, A., Yuen, M. G., and Doyle, B. K. (2006). A case of human cutaneous anthrax. Med J Aust *185*, 281-282.

Kradin, R., MacLean, J., Duckett, S., Schneeberger, E. E., Waeber, C., and Pinto, C. (1997). Pulmonary response to inhaled antigen: neuroimmune interactions promote the recruitment of dendritic cells to the lung and the cellular immune response to inhaled antigen. Am J Pathol *150*, 1735-1743.

Krantz, B. A., Trivedi, A. D., Cunningham, K., Christensen, K. A., and Collier, R. J. (2004). Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. J Mol Biol *344*, 739-756.

Krantz, B. A., Finkelstein, A., and Collier, R. J. (2006). Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. J Mol Biol *355*, 968-979.

Kuipers, H., Hijdra, D., De Vries, V. C., Hammad, H., Prins, J. B., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2003). Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. J Immunol *171*, 3645-3654.

Kuipers, H., Heirman, C., Hijdra, D., Muskens, F., Willart, M., van Meirvenne, S., Thielemans, K., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2004). Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. J Leukoc Biol *76*, 1028-1038.

Kyriacou, D. N., Stein, A. C., Yarnold, P. R., Courtney, D. M., Nelson, R. R., Noskin, G. A., Handler, J. A., and Frerichs, R. R. (2004). Clinical predictors of bioterrorism-related inhalational anthrax. Lancet *364*, 449-452.

Labruyere, E., Mock, M., Ladant, D., Michelson, S., Gilles, A. M., Laoide, B., and Barzu, O. (1990). Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. Biochemistry *29*, 4922-4928.

Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C., and Collier, R. J. (2004a). Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 13147-13151.

Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., and Collier, R. J. (2004b). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 6367-6372.

Laffly, E., Danjou, L., Condemine, F., Vidal, D., Drouet, E., Lefranc, M. P., Bottex, C., and Thullier, P. (2005). Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize the protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* by binding to the segment of PA between residues 686 and 694. Antimicrob Agents Chemother *49*, 3414-3420.

Lagranderie, M., Nahori, M. A., Balazuc, A. M., Kiefer-Biasizzo, H., Lapa e Silva, J. R., Milon, G., Marchal, G., and Vargaftig, B. B. (2003). Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. Immunology *108*, 352-364.

Lambrecht, B. N., Prins, J. B., and Hoogsteden, H. C. (2001). Lung dendritic cells and host immunity to infection. Eur Respir J *18*, 692-704.

Lambrecht, B. N., and Hammad, H. (2003). Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol *3*, 994-1003.

Lambrecht, B. N. (2005). Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. Allergy *60*, 271-282.

Lambrecht, B. (2006a). DC subsets and the control of the allergic airway inflammation. Abstract SC86-512 presented at: 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology (Paris, France).

Lambrecht, B. N. (2006b). Alveolar macrophage in the driver's seat. Immunity *24*, 366-368.

Landsman, L., Varol, C., and Jung, S. (2007). Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. J Immunol *178*, 2000-2007.

Langerhans, P. (1868). Über die Nerven der menschlichen Haut. Virchows Arch Pathol Anat Physiol *44*, 325-337.

Legge, K. L., and Braciale, T. J. (2003). Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. Immunity *18*, 265-277.

Leppla, S. H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 3162-3166.

Leppla, S. H. (1984). *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res *17*, 189-198.

Lim, N. K., Kim, J. H., Oh, M. S., Lee, S., Kim, S. Y., Kim, K. S., Kang, H. J., Hong, H. J., and Inn, K. S. (2005). An anthrax lethal factor-neutralizing monoclonal antibody protects rats before and after challenge with anthrax toxin. Infect Immun *73*, 6547-6551.

Lincoln, R. E., Hodges, D. R., Klein, F., Mahlandt, B. G., Jones, W. I., Jr., Haines, B. W., Rhian, M. A., and Walker, J. S. (1965). Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. J Infect Dis *115*, 481-494.

Lindeque, P. M., and Turnbull, P. C. (1994). Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. Onderstepoort J Vet Res *61*, 71-83.

Lipscomb, M. F., and Masten, B. J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. Physiol Rev *82*, 97-130.

Little, S. F., Leppla, S. H., and Cora, E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin. Infect Immun *56*, 1807-1813.

Little, S. F., Leppla, S. H., and Friedlander, A. M. (1990). Production and characterization of monoclonal antibodies against the lethal factor component of *Bacillus anthracis* lethal toxin. Infect Immun *58*, 1606-1613.

Little, S. F., and Lowe, J. R. (1991). Location of receptor-binding region of protective antigen from *Bacillus anthracis*. Biochem Biophys Res Commun *180*, 531-537.

Little, S. F., Ivins, B. E., Fellows, P. F., and Friedlander, A. M. (1997). Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs. Infect Immun *65*, 5171-5175.

Liu, Y.-J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell *106*, 259-262.

Lu, Q., Wei, W., Kowalski, P. E., Chang, A. C., and Cohen, S. N. (2004). EST-based genome-wide gene inactivation identifies ARAP3 as a host protein affecting cellular susceptibility to anthrax toxin. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 17246-17251.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med *198*, 513-520.

Lyons, C. R., Lovchik, J., Hutt, J., Lipscomb, M. F., Wang, E., Heninger, S., Berliba, L., and Garrison, K. (2004). Murine model of pulmonary anthrax: kinetics of dissemination, histopathology, and mouse strain susceptibility. Infect Immun *72*, 4801-4809.

Makino, S., Watarai, M., Cheun, H. I., Shirahata, T., and Uchida, I. (2002). Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. J Infect Dis *186*, 227-233.

Maldonado-Arocho, F. J., Fulcher, J. A., Lee, B., and Bradley, K. A. (2006). Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. Mol Microbiol *61*, 324-337.

Manchee, R. J., Broster, M. G., Henstridge, R. M., Stagg, A. J., and Melling, J. (1982). Anthrax island. Nature *296*, 598.

Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood *97*, 3333-3341.

Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C. R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M. E., and McKenna, H. J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. Blood *96*, 878-884.

Marino, S., Pawar, S., Fuller, C. L., Reinhart, T. A., Flynn, J. L., and Kirschner, D. E. (2004). Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol *173*, 494-506.

Mason, R. J., Williams, M. C., Widdicombe, J. H., Sanders, M. J., Misfeldt, D. S., and Berry, L. C., Jr. (1982). Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 6033-6037.

Masten, B. J., Olson, G. K., Kusewitt, D. F., and Lipscomb, M. F. (2004). Flt3 ligand preferentially increases the number of functionally active myeloid dendritic cells in the lungs of mice. J Immunol *172*, 4077-4083.

Matute-Bello, G., and Martin, T. R. (2003). Science review: apoptosis in acute lung injury. Crit Care *7*, 355-358.

Matute-Bello, G., Lee, J. S., Frevert, C. W., Liles, W. C., Sutlief, S., Ballman, K., Wong, V., Selk, A., and Martin, T. R. (2004). Optimal timing to

repopulation of resident alveolar macrophages with donor cells following total body irradiation and bone marrow transplantation in mice. J Immunol Methods *292*, 25-34.

Maurer, P. H. (1965). Antigenicity of Polypeptides (Poly Alpha Amino Acids). 13. Immunological Studies with Synthetic Polymers Containing Only D- or D- and L-Alpha-Amino Acids. J Exp Med *121*, 339-349.

Mayer, T. A., Bersoff-Matcha, S., Murphy, C., Earls, J., Harper, S., Pauze, D., Nguyen, M., Rosenthal, J., Cerva, D., Jr., Druckenbrod, G.*, et al.* (2001). Clinical presentation of inhalational anthrax following bioterrorism exposure: report of 2 surviving patients. Jama *286*, 2549-2553.

McWilliam, A. S., Nelson, D., Thomas, J. A., and Holt, P. G. (1994). Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. J Exp Med *179*, 1331-1336.

Menard, A., Altendorf, K., Breves, D., Mock, M., and Montecucco, C. (1996a). The vacuolar ATPase proton pump is required for the cytotoxicity of *Bacillus anthracis* lethal toxin. FEBS Lett *386*, 161-164.

Menard, A., Papini, E., Mock, M., and Montecucco, C. (1996b). The cytotoxic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor is inhibited by leukotriene A4 hydrolase and metallopeptidase inhibitors. Biochem J *320 (Pt 2)*, 687-691.

Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., and Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. Science *266*, 1202-1208.

Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., and Fouet, A. (1998). The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. J Bacteriol *180*, 52-58.

Metchnikoff, E. (1890). Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. Annales de l'institut Pasteur *7*, 321-336.

Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature *442*, 39-44.

Mignot, T., Mock, M., and Fouet, A. (2003). A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. Mol Microbiol *47*, 917-927.

Mizgerd, J. P. (2002). Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. Semin Immunol *14*, 123-132.

Moayeri, M., Haines, D., Young, H. A., and Leppla, S. H. (2003). *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice. J Clin Invest *112*, 670-682.

Mock, M., and Fouet, A. (2001). Anthrax. Annu Rev Microbiol *55*, 647-671.

Mock, M., and Mignot, T. (2003). Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. Cell Microbiol *5*, 15-23.

Mogridge, J., Mourez, M., and Collier, R. J. (2001). Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin. J Bacteriol *183*, 2111-2116.

Mogridge, J., Cunningham, K., and Collier, R. J. (2002). Stoichiometry of anthrax toxin complexes. Biochemistry *41*, 1079-1082.

Morris, D. G., Huang, X., Kaminski, N., Wang, Y., Shapiro, S. D., Dolganov, G., Glick, A., and Sheppard, D. (2003). Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. Nature *422*, 169-173.

Mourez, M., Lacy, D. B., Cunningham, K., Legmann, R., Sellman, B. R., Mogridge, J., and Collier, R. J. (2002). 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. Trends Microbiol *10*, 287-293.

Mulligan, M. S., and Ward, P. A. (1992). Immune complex-induced lung and dermal vascular injury. Differing requirements for tumor necrosis factor-alpha and IL-1. J Immunol *149*, 331-339.

Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med *194*, 1171-1178.

Nakata, K., Gotoh, H., Watanabe, J., Uetake, T., Komuro, I., Yuasa, K., Watanabe, S., Ieki, R., Sakamaki, H., Akiyama, H.*, et al.* (1999). Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. Blood *93*, 667-673.

Nicod, L. P., Lipscomb, M. F., Weissler, J. C., and Toews, G. B. (1989). Mononuclear cells from human lung parenchyma support antigen-induced T lymphocyte proliferation. J Leukoc Biol *45*, 336-344.

Nicod, L. P., Galve-De-Rochemonteix, B., and Dayer, J. M. (1994). Modulation of IL-1 receptor antagonist and TNF-soluble receptors produced by alveolar macrophages and blood monocytes. Ann N Y Acad Sci *725*, 323-330.

Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G.*, et al.* (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science *307*, 254-258.

O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J., and Leppla, S. (1985). Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. Infect Immun *47*, 306-310.

Osterholzer, J. J., Ames, T., Polak, T., Sonstein, J., Moore, B. B., Chensue, S. W., Toews, G. B., and Curtis, J. L. (2005). CCR2 and CCR6, but

Not Endothelial Selectins, Mediate the Accumulation of Immature Dendritic Cells within the Lungs of Mice in Response to Particulate Antigen. J Immunol *175*, 874-883.

Paccani, S. R., Tonello, F., Ghittoni, R., Natale, M., Muraro, L., D'Elios, M. M., Tang, W. J., Montecucco, C., and Baldari, C. T. (2005). Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. J Exp Med *201*, 325-331.

Pandey, J., and Warburton, D. (2004). Knock-on effect of anthrax lethal toxin on macrophages potentiates cytotoxicity to endothelial cells. Microbes Infect *6*, 835-843.

Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., Lacy, D. B., Collier, R. J., Park, S., Leppla, S. H.*, et al.* (2001). Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature *414*, 229-233.

Paolucci, C., Rovere, P., De Nadai, C., Manfredi, A. A., and Clementi, E. (2000). Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor alpha - regulated endocytosis of human dendritic cells in a cyclic GMP-dependent way. J Biol Chem *275*, 19638-19644.

Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z. W., and Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. Science *297*, 2048-2051.

Park, J. M., Greten, F. R., Wong, A., Westrick, R. J., Arthur, J. S., Otsu, K., Hoffmann, A., Montminy, M., and Karin, M. (2005). Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. Immunity *23*, 319-329.

Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. Science *299*, 1033-1036.

Pasteur, L., Chamberland, C., and Roux (1881). Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près de Melun, sur la vaccination charbonneuse. C R Acad Sci *92*, 1378-1383.

Patra, G., Vaissaire, J., Weber-Levy, M., Le Doujet, C., and Mock, M. (1998). Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. J Clin Microbiol *36*, 3412-3414.

Pavli, P., Maxwell, L., Van de Pol, E., and Doe, F. (1996). Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. Clin Exp Immunol *104*, 124-132.

Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1999). Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFNgamma-induced release of NO and TNFalpha. FEBS Lett *462*, 199-204.

Peters-Golden, M. (2004). The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. Am J Respir Cell Mol Biol *31*, 3-7.

Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H., and Liddington, R. C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. Nature *385*, 833-838.

Petrilli, V., Papin, S., and Tschopp, J. (2005). The inflammasome. Curr Biol *15*, R581.

Pezard, C., Berche, P., and Mock, M. (1991). Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. Infect Immun *59*, 3472-3477.

Pimental, R. A., Christensen, K. A., Krantz, B. A., and Collier, R. J. (2004). Anthrax toxin complexes: heptameric protective antigen can bind lethal factor and edema factor simultaneously. Biochem Biophys Res Commun *322*, 258-262.

Pittman, P. R., Hack, D., Mangiafico, J., Gibbs, P., McKee, K. T., Jr., Friedlander, A. M., and Sjogren, M. H. (2002). Antibody response to a delayed booster dose of anthrax vaccine and botulinum toxoid. Vaccine *20*, 2107-2115.

Popov, S. G., Villasmil, R., Bernardi, J., Grene, E., Cardwell, J., Popova, T., Wu, A., Alibek, D., Bailey, C., and Alibek, K. (2002a). Effect of *Bacillus anthracis* lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells. FEBS Lett *527*, 211-215.

Popov, S. G., Villasmil, R., Bernardi, J., Grene, E., Cardwell, J., Wu, A., Alibek, D., Bailey, C., and Alibek, K. (2002b). Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. Biochem Biophys Res Commun *293*, 349-355.

Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W., Holmes, E. C., and Maiden, M. C. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. J Bacteriol *186*, 7959-7970.

Pugh, C. W., MacPherson, G. G., and Steer, H. W. (1983). Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. J Exp Med *157*, 1758-1779.

Pulendran, B. (2005). Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. J Immunol *174*, 2457-2465.

Qin, L., Quinlan, W. M., Doyle, N. A., Graham, L., Sligh, J. E., Takei, F., Beaudet, A. L., and Doerschuk, C. M. (1996). The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in mice. J Immunol *157*, 5016-5021.

Quesnel-Hellmann, A., Cleret, A., Vidal, D. R., and Tournier, J. N. (2006). Evidence for adjuvanticity of anthrax edema toxin. Vaccine *24*, 699-702.

Quinn, C. P., Dull, P. M., Semenova, V., Li, H., Crotty, S., Taylor, T. H., Steward-Clark, E., Stamey, K. L., Schmidt, D. S., Stinson, K. W.,

et al. (2004). Immune responses to *Bacillus anthracis* protective antigen in patients with bioterrorism-related cutaneous or inhalation anthrax. J Infect Dis *190*, 1228-1236.

Rainey, G. J., Wigelsworth, D. J., Ryan, P. L., Scobie, H. M., Collier, R. J., and Young, J. A. (2005). Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 13278-13283.

Randolph, G. J., Angeli, V., and Swartz, M. A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. Nat Rev Immunol *5*, 617-628.

Ratzinger, G., Reagan, J. L., Heller, G., Busam, K. J., and Young, J. W. (2003). Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. Blood *101*, 1422-1429.

Reibman, J., Hsu, Y., Chen, L. C., Bleck, B., and Gordon, T. (2003). Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. Am J Respir Cell Mol Biol *28*, 648-654.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. Nat Rev Immunol *6*, 476-483.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol *2*, 361-367.

Rhie, G. E., Roehrl, M. H., Mourez, M., Collier, R. J., Mekalanos, J. J., and Wang, J. Y. (2003). A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 10925-10930.

Riccobon, A., Gabrielli, F., Petrini, M., Fiammenghi, L., Stefanelli, M., Cesca, M., Ridolfi, L., Ridolfi, R., Concetti, A., and Venanzi, F. M. (2006). Prostaglandin E2 (PGE2) induces tumor endothelial marker 8 (TEM8) gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. Abstract P5.018 presented at: 9th International Conference Dendritic Cells (Edinburgh).

Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science *283*, 1183-1186.

Roberts, J. E., Watters, J. W., Ballard, J. D., and Dietrich, W. F. (1998). Ltx1, a mouse locus that influences the susceptibility of macrophages to cytolysis caused by intoxication with *Bacillus anthracis* lethal factor, maps to chromosome 11. Mol Microbiol *29*, 581-591.

Robertson, D. L., Tippetts, M. T., and Leppla, S. H. (1988). Nucleotide sequence of the *Bacillus anthracis* edema factor gene (cya): a calmodulin-dependent adenylate cyclase. Gene *73*, 363-371.

Robinson, M. J., Sancho, D., Slack, E. C., Leibundgut-Landmann, S., and Sousa, C. R. (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. Nat Immunol *7*, 1258-1265.

Rosenberger, C. M., and Finlay, B. B. (2003). Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 385-396.

Ross, J. M. (1957). The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by respiratory route. J Path Bact *LXXIII*, 485-493.

Rosseau, S., Hammerl, P., Maus, U., Walmrath, H. D., Schutte, H., Grimminger, F., Seeger, W., and Lohmeyer, J. (2000). Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *279*, L25-35.

Rossi, M., and Young, J. W. (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. J Immunol *175*, 1373-1381.

Russell, D. G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 569-577.

Ruthel, G., Ribot, W. J., Bavari, S., and Hoover, T. A. (2004). Time-lapse confocal imaging of development of *Bacillus anthracis* in macrophages. J Infect Dis *189*, 1313-1316.

Ryter, A. (1965). [Morphologic Study of the Sporulation of *Bacillus Subtilis*.]. Ann Inst Pasteur (Paris) *108*, 40-60.

Salles, II, Voth, D. E., Ward, S. C., Averette, K. M., Tweten, R. K., Bradley, K. A., and Ballard, J. D. (2006). Cytotoxic activity of *Bacillus anthracis* protective antigen observed in a macrophage cell line overexpressing ANTXR1. Cell Microbiol *8*, 1272-1281.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med *179*, 1109-1118.

Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., and Rodriguez-Fernandez, J. L. (2006). The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. J Immunol *176*, 5153-5159.

Sansonetti, P. J. (2006). The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. Nat Immunol *7*, 1237-1242.

Santelli, E., Bankston, L. A., Leppla, S. H., and Liddington, R. C. (2004). Crystal structure of a

complex between anthrax toxin and its host cell receptor. Nature *430*, 905-908.

Sawyer, R. T., Strausbauch, P. H., and Volkman, A. (1982). Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. Lab Invest *46*, 165-170.

Scandella, E., Men, Y., Legler, D. F., Gillessen, S., Prikler, L., Ludewig, B., and Groettrup, M. (2004). CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. Blood *103*, 1595-1601.

Schon-Hegrad, M. A., Oliver, J., McMenamin, P. G., and Holt, P. G. (1991). Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. J Exp Med *173*, 1345-1356.

Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A., and Young, J. A. (2003). Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 5170-5174.

Scobie, H. M., and Young, J. A. (2005). Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. Curr Opin Microbiol *8*, 106-112.

Scobie, H. M., Wigelsworth, D. J., Marlett, J. M., Thomas, D., Rainey, G. J., Lacy, D. B., Manchester, M., Collier, R. J., and Young, J. A. (2006). Anthrax toxin receptor 2-dependent lethal toxin killing in vivo. PLoS Pathog *2*, e111.

Sellman, B. R., Nassi, S., and Collier, R. J. (2001). Point mutations in anthrax protective antigen that block translocation. J Biol Chem *276*, 8371-8376.

Seong, S. Y., and Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. Nat Rev Immunol *4*, 469-478.

Sertl, K., Takemura, T., Tschachler, E., Ferrans, V. J., Kaliner, M. A., and Shevach, E. M. (1986). Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. J Exp Med *163*, 436-451.

Shafazand, S., Doyle, R., Ruoss, S., Weinacker, A., and Raffin, T. A. (1999). Inhalational anthrax: epidemiology, diagnosis, and management. Chest *116*, 1369-1376.

Shepherd, V. L. (2002). Pulmonary surfactant protein D: a novel link between innate and adaptive immunity. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *282*, L516-517.

Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C., Greer, P., Tatti, K., Fischer, M., Layton, M., Philips, M., Bresnitz, E., Quinn, C. P., *et al.* (2003). The critical role of pathology in the investigation of bioterrorism-related cutaneous anthrax. Am J Pathol *163*, 1901-1910.

Shlyakhov, E. N., and Rubinstein, E. (1994). Human live anthrax vaccine in the former USSR. Vaccine *12*, 727-730.

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. Science *284*, 1835-1837.

Singh, Y., Leppla, S. H., Bhatnagar, R., and Friedlander, A. M. (1989). Internalization and processing of *Bacillus anthracis* lethal toxin by toxin-sensitive and -resistant cells. J Biol Chem *264*, 11099-11102.

Sirard, J. C., Mock, M., and Fouet, A. (1994). The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. J Bacteriol *176*, 5188-5192.

Sirisanthana, T., and Brown, A. E. (2002). Anthrax of the gastrointestinal tract. Emerg Infect Dis *8*, 649-651.

Smith, H., and Keppie, J. (1954). Observations on experimental anthrax; demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by *Bacillus anthracis*. Nature *173*, 869-870.

Smith, H., Keppie, J., and Stanley, J. L. (1955). The chemical basis of the virulence of Bacillus anthracis. V. The specific toxin produced by *B. Anthracis* in vivo. Br J Exp Pathol *36*, 460-472.

Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2005). Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. Nat Immunol *6*, 163-170.

SSA (2004). Protection médicale contre le risque biologique militaire. Ministère de la défense, Service de Santé des Armées.

Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Phan, S. H., Rollins, B. J., and Strieter, R. M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. J Biol Chem *266*, 9912-9918.

Stanley, E., Lieschke, G. J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J. A., Maher, D. W., Cebon, J., Sinickas, V., and Dunn, A. R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 5592-5596.

Stanley, J. L., and Smith, H. (1961). Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. J Gen Microbiol *26*, 49-63.

Starnbach, M. N., and Collier, R. J. (2003). Anthrax delivers a lethal blow to host immunity. Nat Med *9*, 996-997.

Steele, A. D., Warfel, J. M., and D'Agnillo, F. (2005). Anthrax lethal toxin enhances cytokine-

induced VCAM-1 expression on human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun *337*, 1249-1256.

Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med *137*, 1142-1162.

Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol *21*, 685-711.

Sterne, M. (1937a). Avirulent anthrax vaccine. Onderstepoort J Vet Sci Animal Ind *7*, 41-43.

Sterne, M. (1937b). Variation in *Bacillus anthracis*. Onderstepoort J Vet Sci Animal Ind *8*, 271-349.

Stevens, A., and Lowe, J. (1992). Histology (London, New-York, Gower Medical Publishing).

Stragier, P., and Losick, R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annu Rev Genet *30*, 297-241.

Strauch, M. A., Ballar, P., Rowshan, A. J., and Zoller, K. L. (2005). The DNA-binding specificity of the *Bacillus anthracis* AbrB protein. Microbiology *151*, 1751-1759.

Strobl, H., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Rappersberger, K., Majdic, O., and Knapp, W. (1996). TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. J Immunol *157*, 1499-1507.

Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S., and Holt, P. G. (1998). Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. J Exp Med *188*, 2019-2031.

Stumbles, P. A., Strickland, D. H., Pimm, C. L., Proksch, S. F., Marsh, A. M., McWilliam, A. S., Bosco, A., Tobagus, I., Thomas, J. A., Napoli, S.*, et al.* (2001). Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. J Immunol *167*, 228-234.

Suda, T., McCarthy, K., Vu, Q., McCormack, J., and Schneeberger, E. E. (1998). Dendritic cell precursors are enriched in the vascular compartment of the lung. Am J Respir Cell Mol Biol *19*, 728-737.

Sung, S. S., Fu, S. M., Rose, C. E., Jr., Gaskin, F., Ju, S. T., and Beaty, S. R. (2006). A Major Lung CD103 ({alpha}E)-beta7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins. J Immunol *176*, 2161-2172.

Swanson, K. A., Zheng, Y., Heidler, K. M., Zhang, Z. D., Webb, T. J., and Wilkes, D. S. (2004). Flt3-ligand, IL-4, GM-CSF, and adherence-mediated isolation of murine lung dendritic cells: assessment of isolation technique on phenotype and function. J Immunol *173*, 4875-4881.

Sylvestre, P. (2003) Analyse structurale et fonctionnelle de l'exosporium de *Bacillus anthracis*. Thèse d'université. Université Paris 7.

Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J. L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P. H., de Blic, J., Tazi, A.*, et al.* (2005). DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. PLoS Med *2*, e381.

Takabayshi, K., Corr, M., Hayashi, T., Redecke, V., Beck, L., Guiney, D., Sheppard, D., and Raz, E. (2006). Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. Immunity *24*, 475-487.

Takahashi, H., Sano, H., Chiba, H., and Kuroki, Y. (2006). Pulmonary surfactant proteins a and d: innate immune functions and biomarkers for lung diseases. Curr Pharm Des *12*, 598.

Tang, G., and Leppla, S. H. (1999). Proteasome activity is required for anthrax lethal toxin to kill macrophages. Infect Immun *67*, 3055-3060.

Tarling, J. D., Lin, H. S., and Hsu, S. (1987). Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. J Leukoc Biol *42*, 443-446.

Thepen, T., Van Rooijen, N., and Kraal, G. (1989). Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. J Exp Med *170*, 499-509.

Thomas, E. D., Ramberg, R. E., Sale, G. E., Sparkes, R. S., and Golde, D. W. (1976). Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. Science *192*, 1016-1018.

Tournier, J. N., Quesnel-Hellmann, A., Mathieu, J., Montecucco, C., Tang, W. J., Mock, M., Vidal, D. R., and Goossens, P. L. (2005). Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. J Immunol *174*, 4934-4941.

Tournier, J. N., and Quesnel-Hellmann, A. (2006). Host-pathogen interactions: a biological rendez-vous of the infectious nonself and danger models? PLoS Pathog *2*, e44.

Tournier, J. N., Quesnel-Hellmann, A., Cleret, A., and Vidal, D. R. (2007). Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. Cell Microbiol *9*, 555-565.

Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., and Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. Science *290*, 2152-2154.

Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 95-104.

Tsoumakidou, M., Tzanakis, N., Papadaki, H. A., Koutala, H., and Siafakas, N. M. (2006). Isolation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human bronchoalveolar lavage fluid. Immunol Cell Biol *84*, 267-273.

Tucker, A. E., Salles, II, Voth, D. E., Ortiz-Leduc, W., Wang, H., Dozmorov, I., Centola, M., and Ballard, J. D. (2003). Decreased glycogen synthase kinase 3-beta levels and related physiological changes in *Bacillus anthracis* lethal toxin-treated macrophages. Cell Microbiol *5*, 523-532.

Turnbull, P. C. (2000). Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. Curr Opin Infect Dis *13*, 113-120.

Ulmer, T. S., Soelaiman, S., Li, S., Klee, C. B., Tang, W. J., and Bax, A. (2003). Calcium dependence of the interaction between calmodulin and anthrax edema factor. J Biol Chem *278*, 29261-29266.

Upham, J. W., and Stick, S. M. (2006). Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. Curr Drug Targets *7*, 541-545.

Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y. (2002). Characterization of the *Bacillus subtilis* ywsC gene, involved in gamma-polyglutamic acid production. J Bacteriol *184*, 337-343.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J.*, et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity *12*, 71-81.

Vallon-Eberhard, A., Landsman, L., Yogev, N., Verrier, B., and Jung, S. (2006). Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. J Immunol *176*, 2465-2469.

van Haarst, J. M., de Wit, H. J., Drexhage, H. A., and Hoogsteden, H. C. (1994a). Distribution and immunophenotype of mononuclear phagocytes and dendritic cells in the human lung. Am J Respir Cell Mol Biol *10*, 487-492.

van Haarst, J. M., Hoogsteden, H. C., de Wit, H. J., Verhoeven, G. T., Havenith, C. E., and Drexhage, H. A. (1994b). Dendritic cells and their precursors isolated from human bronchoalveolar lavage: immunocytologic and functional properties. Am J Respir Cell Mol Biol *11*, 344-350.

van Haarst, J. M., Verhoeven, G. T., de Wit, H. J., Hoogsteden, H. C., Debets, R., and Drexhage, H. A. (1996). CD1a+ and CD1a- accessory cells from human bronchoalveolar lavage differ in allostimulatory potential and cytokine production. Am J Respir Cell Mol Biol *15*, 752-759.

van Rijt, L. S., Kuipers, H., Vos, N., Hijdra, D., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2004). A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. J Immunol Methods *288*, 111-121.

Van Voorhis, W. C., Hair, L. S., Steinman, R. M., and Kaplan, G. (1982). Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. J Exp Med *155*, 1172-1187.

Vasconcelos, D., Barnewall, R., Babin, M., Hunt, R., Estep, J., Nielsen, C., Carnes, R., and Carney, J. (2003). Pathology of inhalation anthrax in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Lab Invest *83*, 1201-1209.

Vermaelen, K. Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B. N., and Pauwels, R. A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. J Exp Med *193*, 51-60.

Vermaelen, K., and Pauwels, R. (2003). Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. Am J Respir Cell Mol Biol *29*, 405-409.

Vermaelen, K., and Pauwels, R. (2004). Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. Cytometry A *61*, 170-177.

Vermaelen, K., and Pauwels, R. (2005). Pulmonary dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med *172*, 530-551.

Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1998). Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. Biochem Biophys Res Commun *248*, 706-711.

Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M., and Montecucco, C. (2000). Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. Biochem J *352 Pt 3*, 739-745.

von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J. A., Strickland, D. H., Holt, P. G., and Stumbles, P. A. (2005). Anatomical Location Determines the Distribution and Function of Dendritic Cells and Other APCs in the Respiratory Tract. J Immunol *175*, 1609-1618.

Voth, D. E., Hamm, E. E., Nguyen, L. G., Tucker, A. E., Salles, II, Ortiz-Leduc, W., and Ballard, J. D. (2005). *Bacillus anthracis* oedema toxin as a cause of tissue necrosis and cell type-specific cytotoxicity. Cell Microbiol *7*, 1139-1149.

Wang, H., Peters, N., Laza-Stanca, V., Nawroly, N., Johnston, S. L., and Schwarze, J. (2006). Local CD11c+ MHC class II- precursors generate lung dendritic cells during respiratory viral infection, but are depleted in the process. J Immunol *177*, 2536-2542.

Wang, J., Snider, D. P., Hewlett, B. R., Lukacs, N. W., Gauldie, J., Liang, H., and Xing, Z. (2000). Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung. Blood *95*, 2337-2345.

Warfel, J. M., Steele, A. D., and D'Agnillo, F. (2005). Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. Am J Pathol *166*, 1871-1881.

Wei, W., Lu, Q., Chaudry, G. J., Leppla, S. H., and Cohen, S. N. (2006). The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. Cell *124*, 1141-1154.

Welkos, S. L., Keener, T. J., and Gibbs, P. H. (1986). Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. Infect Immun *51*, 795-800.

Welkos, S. L., and Friedlander, A. M. (1988). Comparative safety and efficacy against *Bacillus anthracis* of protective antigen and live vaccines in mice. Microb Pathog *5*, 127-139.

Weyde, J., Wassermann, K., and Schell-Frederick, E. (1997). Analysis of single and double-stained alveolar macrophages by flow cytometry. J Immunol Methods *207*, 115-123.

Whiting, G. C., Rijpkema, S., Adams, T., and Corbel, M. J. (2004). Characterisation of adsorbed anthrax vaccine by two-dimensional gel electrophoresis. Vaccine *22*, 4245-4251.

Wild, M. A., Xin, H., Maruyama, T., Nolan, M. J., Calveley, P. M., Malone, J. D., Wallace, M. R., and Bowdish, K. S. (2003). Human antibodies from immunized donors are protective against anthrax toxin in vivo. Nat Biotechnol *21*, 1305-1306.

Wright, G. G., Green, T. W., and Kanode, R. G., Jr. (1954). Studies on immunity in anthrax. V. Immunizing activity of alum-precipitated protective antigen. J Immunol *73*, 387-391.

Wright, G. G., and Puziss, M. (1957). Elaboration of protective antigen of *Bacillus anthracis* under anaerobic conditions. Nature *179*, 916-917.

Wright, G. G., and Mandell, G. L. (1986). Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. J Exp Med *164*, 1700-1709.

Wu, A. G., Alibek, D., Li, Y. L., Bradburne, C., Bailey, C. L., and Alibek, K. (2003). Anthrax toxin induces hemolysis: an indirect effect through polymorphonuclear cells. J Infect Dis *188*, 1138-1141.

Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. Blood *98*, 3376-3382.

Wu, L., and Dakic, A. (2004). Development of dendritic cell system. Cell Mol Immunol *1*, 112-118.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science *286*, 525-528.

Zilinskas, R. A. (1997). Iraq's biological weapons. The past as future? Jama *278*, 418-424.

Zwartouw, H. T., and Smith, H. (1956). Polyglutamic acid from *Bacillus anthracis* grown *in vivo* : structure and aggressin activity. Biochem J *63*, 437-454.

Annexes

Annexe I

Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax

Jean-Nicolas Tournier, Anne Quesnel-Hellmann,
Aurélie Cleret, Dominique R. Vidal

Cellular Microbiology, 2007, 9: 555-565

Cellular Microbiology (2007) **9**(3), 555–565
doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00866.x
First published online 11 January 2007

Microreview

Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax

Jean-Nicolas Tournier,* Anne Quesnel-Hellmann, Aurélie Cleret and Dominique R. Vidal
Pôle interactions hôte-pathogènes, Département de biologie des agents transmissibles, CRSSA, F-38702 La Tronche cedex, France.

Summary

Inhalational anthrax is a life-threatening infectious disease of considerable concern, especially as a potential bioterrorism agent. Progress is gradually being made towards understanding the mechanisms used by *Bacillus anthracis* to escape the immune system and to induce severe septicaemia associated with toxaemia and leading to death. Recent advances in fundamental research have revealed previously unsuspected roles for toxins in various cell types. We summarize here pathological data for animal models and macroscopic histological examination data from recent clinical records, which we link to the effects of toxins. We describe three major steps in infection: (i) an invasion phase in the lung, during which toxins have short-distance effects on lung phagocytes; (ii) a phase of bacillus proliferation in the mediastinal lymph nodes, with local effects of toxins; and (iii) a terminal, diffusion phase, characterized by a high blood bacterial load and by long-distance effects of toxins, leading to host death. The pathophysiology of inhalational anthrax thus involves interactions between toxins and various cell partners, throughout the course of infection.

'This experimental infection is not a true pulmonary disease, but serves to show how infective particles may set up a generalised infection after introduction through the uninjured respiratory tract (Barnes, 1947).'

Introduction

Bacillus anthracis is a Gram-positive, spore-forming bacterium responsible for two highly contrasted clinical diseases: the inhalational form, which is extremely severe, fulminating and difficult to diagnose, and the cutaneous form, which is relatively benign and easily identified and treated with antibiotics. The main features of inhalational anthrax were first described in 1888, when Buchner showed that animals exposed to clouds of spores did not develop a true pulmonary disease (Buchner, 1888). However, Buchner was unable to identify the pulmonary site at which the spores germinated. After the Second World War, several teams tried to resolve this mystery, using animal models such as monkeys, rabbits, guinea pigs and mice (Young *et al*., 1946; Barnes, 1947). These studies were the first to report that host invasion involved the lymphatic system, with no evidence of lung injury. In the late 1950s, Ross investigated the precise kinetics of inhalational infection in a guinea pig model of intratracheal infection (Ross, 1957): within 1 h, all the spores were taken up by lung phagocytes migrating towards the peribronchiolar, perivascular lymphatic channel; within 4 h, spores were detectable in phagocytes in the lymph glands; after 24 h, unrestricted bacillus proliferation was observed in the blood. Ross reported no recruitment of polymorphonuclear neutrophils (PMN) or lung injury at any time. Studies on Rhesus monkeys (Henderson *et al*., 1956; Lincoln *et al*., 1965) and chimpanzees (Albrink and Goodlow, 1959) infected with spore aerosols confirmed that spores were taken up by alveolar macrophages (AM), by phagocytosis, and carried to regional lymph nodes in the mediastinum within 6–18 h. Interestingly, macroscopic and pathological analysis at autopsy of human cases of natural (Albrink *et al*., 1960; Brachman *et al*., 1961) or provoked (Sverdlosk in the former USSR) inhalational anthrax (Abramova *et al*., 1993; Grinberg *et al*., 2001) outbreaks have shown that the spores are carried by phagocytes accumulating in the capsular sinus of the mediastinal lymph nodes, where the spores germinate and the bacilli proliferate, producing chains of bacteria, which then diffuse into the blood. Interest in the pathophysiology of pulmonary anthrax was stimulated by the bioterrorist attacks in 2001. Unlike the 82 spontaneous cases recorded during the 20th century (Holty *et al*., 2006), the 11 cases of inhalational anthrax resulting from these bioterrorist attacks have been described in depth (Borio *et al*.,

Received 29 August, 2006; revised 24 October, 2006; accepted 25 October, 2006. *For correspondence. E-mail jntournier@crssa.net; Tel. (+33) 476 636 848; Fax (+33) 476 636 917.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

2001; Jernigan *et al*., 2001; Mayer *et al*., 2001; Barakat *et al*., 2002; Mina *et al*., 2002). Clinical signs, such as vomiting and coughing, together with mediastinal widening on chest X-ray (the best clinical predictor), reflect the massive migration of lung phagocytes, leading to mediastinal lymphadenitis (Kyriacou *et al*., 2004). An analysis of autopsy samples from the five fatal cases of inhalational anthrax resulting from the bioterrorist attacks in 2001 led to a reassessment of previous necropsy studies, demonstrating the key role played by lung phagocytes as pathogen vectors (Guarner *et al*., 2003).

Although recent studies have provided insight into the mechanisms by which spores, capsule and toxins exert their effects in infection models (Vasconcelos *et al*., 2003; Lyons *et al*., 2004; Drysdale *et al*., 2005; Heninger *et al*., 2006), little effort has been made to link histological findings in animal models and clinical records to recent data. This Microreview aims to bring together the puzzling array of data concerning the disruptive effects of toxins on their intracellular targets, identifying a putative role for these toxins in inhalational anthrax. We thus hope to generate a new picture of the role of toxins in inhalational anthrax.

The molecular characterization of lethal and oedema toxin effects: confounding factors for cell signalling and survival

The toxins secreted by *B. anthracis* were identified by Smith in the 1950s (Keppie *et al*., 1953). These toxins were thought to act as the terminal effectors of host death, in conjunction with septicaemia (Smith *et al*., 1955a,b; 1954). It was subsequently demonstrated that the two major virulence factors of *B. anthracis* (toxins and capsule) were encoded by two different plasmids (pXO1 bearing the toxin genes and pXO2, bearing the capsule genes) (Mikesell *et al*., 1983; Green *et al*., 1985). Anthrax toxins are formed by the association of three factors [reviewed in the study by Abrami *et al*. (2005)]. These three factors are the protective antigen (PA), the lethal factor (LF) and the oedema factor (EF). Intravenous injections of PA + LF (lethal toxin, LT) have been shown to be lethal (Beall *et al*., 1962). Intradermal injections of PA + EF (or oedema toxin, ET) induce oedema in the skin (Stanley and Smith, 1961), and may also be lethal. The role of toxins in strain virulence *in vivo* has been demonstrated by gene deletion, showing a synergic effect of EF and LF (Pezard *et al*., 1991). Crystal structures have been obtained for all three components of these toxins (Petosa *et al*., 1997; Pannifer *et al*., 2001; Drum *et al*., 2002). This Microreview is restricted to information essential to our understanding of how these toxins interfere with the host signalling system (Fig. 1). Briefly, PA binds to at least two cellular receptors – ANTXR1/TEM-8 and ANTXR2/CMG-2 – and to a co-receptor identified as the LDL receptor-related protein (LRP) 6 (Bradley *et al*., 2001; Scobie *et al*., 2003; Wei *et al*., 2006). The precise kinetics of PA–ANTXR interactions and subsequent intracellular events are complex, and beyond the scope of this Microreview (Abrami *et al*., 2005; Scobie and Young, 2005), but LRP6 may play a crucial role in the internalization signal (Wei *et al*., 2006). Following the cleavage of PA (83 kDa) by a furin-like protease, releasing a 20 kDa peptide from the N-terminus, PA63 self-assembles to form a heptameric prepore. Endocytosis is both lipid raft-dependent and clathrin-mediated, leading to prepore-receptor transport through the early endosome in intraluminal vesicles called multivesicular bodies (MVB) and delivery to the late endosome. Under acidic endosome conditions, the pore is formed by a PA heptamer and the LF/EF moieties are translocated in MVBs. These MVBs can fuse with endosomal membrane and deliver LF/EF into the cytosol, where these compounds exert their toxic effects [for a detailed review on endocytosis see the study by Abrami *et al*. (2005)]. LF is a zinc-dependent metalloprotease that cleaves most mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases (MKK) (Duesbery *et al*., 1998), whereas EF is a calcium- and calmodulin-dependent adenylate cyclase that increases intracellular cAMP concentration (Leppla, 1982), leading to various disruptions of cytokine secretion (Tournier *et al*., 2005) and an increase in ANTXR expression resulting in an increase in the rate of toxin internalization (Maldonado-Arocho *et al*., 2006). The effects of LT on MAPK pathways and the ultimate effect on cell function remain unclear, as one study on dendritic cells (DCs) showed that the secretion of all cytokines was inhibited (Agrawal *et al*., 2003), whereas we observed more selective effects correlated with a balance between p38 and ERK inhibition (Tournier *et al*., 2005). LT has been shown to induce macrophage cell death in several mouse strains (Friedlander *et al*., 1993). Mouse strain macrophage susceptibility was recently linked to the polymorphic locus *Nalp1b* (Boyden and Dietrich, 2006). Interestingly, the product of this locus, NALP1, is a key component of the inflammasome – a multiprotein complex responsible for the activation of caspases 1 and 5, leading to processing and secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-18 (Tschopp *et al*., 2003; Petrilli *et al*., 2005). Several studies have shown that MKK cleavage occurs in both resistant and susceptible mouse cells (Park *et al*., 2002; Alileche *et al*., 2005), whereas NALP1 activation occurs in susceptible macrophages only (Boyden and Dietrich, 2006). These data suggest that LT-related cell death is not dependent on MKK cleavage. It has been independently shown that LT induces the apoptosis of activated macrophages via a p38α-dependent pathway (Park *et al*., 2002). Another apoptosis pathway, involving the activation of PKR downstream from TLR4 by *B. anthracis* motifs has recently been described (Hsu *et al*., 2004). Surprisingly,

© 2007 The Authors

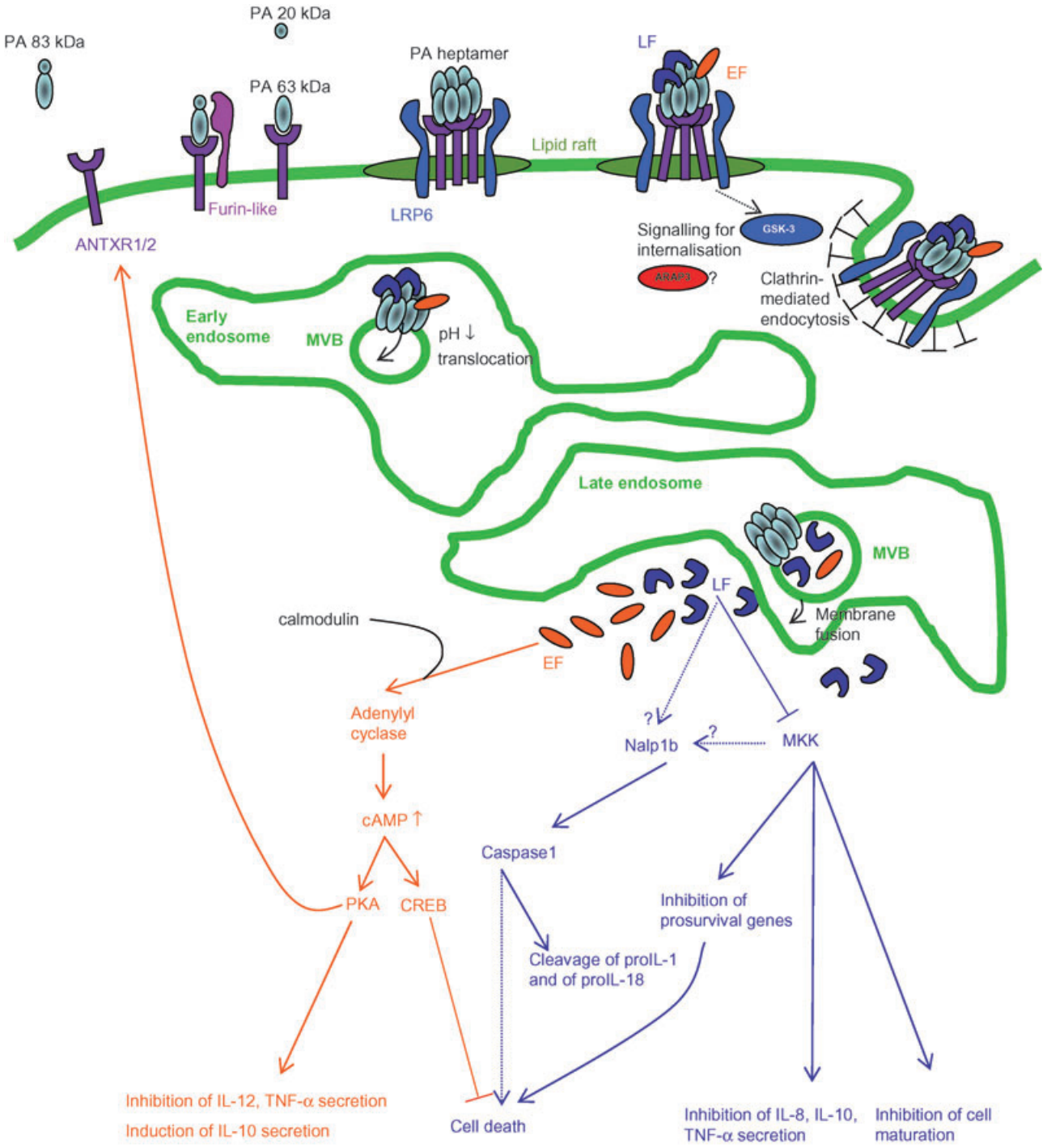


Fig. 1. Current model of cellular toxin effects. Following its interaction with two cellular receptors (ANTXR1/2), the 83 kDa protective antigen (PA) is cleaved by a furin-like protein. LRP6 may play a crucial role in transmitting the internalisation signal. PA63 self-assembles to form a heptameric prepore that facilitates the entry of lethal factor (LF) and oedema factor (EF) into the cytosol, where they exert their toxic effects after internalization. LF is a zinc-dependent metalloprotease that cleaves most mitogen-activated protein kinase kinases (MKK), whereas EF is a calcium- and calmodulin-dependent adenylate cyclase that increases intracellular cAMP concentration (see the text for detailed information). MVB, multivesicular bodies.

© 2007 The Authors

the transcription factor CREB is a crucial target in the maintenance of macrophage survival in the context of LT-induced TLR4-dependent cell death (Park *et al*., 2005). ET rescues cells from TLR4-induced apoptosis, via the downstream activation of protein kinase A (PKA) and CREB. It therefore appears that death pathways are more complex than was initially thought.

Toxins can act both from within phagosomes (Guidi-Rontani *et al*., 1999; 2001; Banks *et al*., 2005) and at distance (Moayeri *et al*., 2003; Firoved *et al*., 2005). This has major pathophysiological implications, accounting for the efficacy of toxins from early to late phases of the disease. Several reviews have previously addressed the cellular effects of toxins on immune response and have focused mainly on LT, which is the best described toxin (Agrawal and Pulendran, 2004; Fukao, 2004; Moayeri and Leppla, 2004; Baldari *et al*., 2006; Banks *et al*., 2006). Here, we will focus on several key steps in which LT and ET may contribute to the pathogenesis and clinical manifestations of inhalational anthrax.

The early phase of inhalational anthrax: phagocytosis by lung antigen-presenting cells (APCs) and silencing of the first innate alarms

In inhalational anthrax, the spores are first captured by pulmonary phagocytes (Fig. 2). The main phagocyte populations present in the alveoli are AMs, as shown by cell analyses of bronchoalveolar lavages (Cleret *et al*., 2006). Spore motifs are recognized by pattern recognition receptors through an MyD88-dependent mechanism (Glomski *et al*., 2007), whereas vegetative bacilli signal through TLR2 (Hughes *et al*., 2005) and anthrolysin O signals through TLR4 (Park *et al*., 2004). AMs are thought to act as a 'Trojan horse' during infection (Guidi-Rontani *et al*., 1999; 2002). Lung dendritic cells (LDC) constitute another population of interest, although it remains unclear whether this population is present in the mucosa or alveoli in basal conditions, or whether there is traffic between these two compartments for sampling of the alveolar environment. Recent work has shown that LDCs continually sample the contents of the alveoli, migrating to the mediastinal lymph nodes, unlike the AM population (Jakubzick *et al*., 2006). Spores may germinate within AMs or LDCs as shown in studies carried out *in vitro* (Guidi-Rontani *et al*., 1999; Dixon *et al*., 2000; Ruthel *et al*., 2004), and toxins may also be secreted from within these cells (Banks *et al*., 2005). The respective roles of these two cell subsets remain unclear, but phagocytosis is most efficient with LDCs (Cleret *et al*., 2006), and several reports have shown macrophage sporocidal activities *in vitro*, against germinating spores at least (Welkos *et al*., 2002; Bozue *et al*., 2005; Hu *et al*., 2006; Ribot *et al*., 2006). The LDC population is of particular interest in studies of *B. anthracis*, because anthrax spores have been shown to trigger the reprogramming of chemokine expression by human DCs because of a loss of transcription in tissue retaining chemokine receptors (CCR2, CCR5) and the induction of lymph node homing receptor CCR7 gene transcription (Brittingham *et al*., 2005). This reprogramming of chemokine receptor gene transcription clearly indicates that *B. anthracis* may make use of the ability of phagocytes to migrate. As LDCs are more efficient than AMs for both phagocytosis and migration, they may be the most suitable 'vehicle' for spreading germinating spores through the alveolo-capillary wall (Cleret *et al*., 2006). LT has been shown to abolish the secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages (Pellizzari *et al*., 1999; Erwin *et al*., 2001; Bergman *et al*., 2005; Ribot *et al*., 2006) and DCs, in several human and murine models (Agrawal *et al*., 2003; Alileche *et al*., 2005; Brittingham *et al*., 2005; Tournier *et al*., 2005). We showed, in a spore infection model, that ET has specific inhibitory effects and that this toxin cooperates with LT (Tournier *et al*., 2005). LT also disrupts pulmonary phagocytes by inhibiting the production of phospholipase A2 type IIA, a crucial product for anthrax spore killing (Gimenez *et al*., 2004). LT has been shown to inhibit the bactericidal activity of non-human primate AMs (Ribot *et al*., 2006). Thus, LT and ET clearly inhibit the early secretion of pro-inflammatory cytokines and the activation and/or recruitment of other cells, such as PMN and monocytes.

ET and LT have been shown to inhibit the priming of PMNs (O'Brien *et al*., 1985; Wright and Mandell, 1986), and their ability to generate superoxide for bacterial killing (Crawford *et al*., 2006). LT has been shown to prevent the chemotaxis of PMNs, via MKK-1-independent mechanisms involving the inhibition of actin polymerization (During *et al*., 2005). In inhalational infections, LT blocks the recruitment of PMNs at two crucial levels: by switching off chemokine production by DCs (Brittingham *et al*., 2005), and by blocking the chemotaxis of responding cells (During *et al*., 2005). The monocytes are the only remaining cells in the bloodstream that could potentially be mobilized to fight *B. anthracis* proliferation in the alveoli. However, LT inhibits the differentiation of monocytes into macrophages, thereby preventing them from destroying pathogens (Kassam *et al*., 2005). In a recent study, macrophages were found to be critical to host survival in a mouse model of infection, whereas PMNs seemed to play a secondary, but necessary role in a fully functional immune response to spores (Cote *et al*., 2006).

These data clearly show that both LT and ET play prominent roles in silencing the phagocytes encountered in the alveoli (AMs and LDCs). Furthermore, the germinating spores seem to use AMs and/or LDCs, as a silent vehicle (or 'Trojan horse') to carry them across the alveolo-capillary space, enabling them to migrate into the

© 2007 The Authors

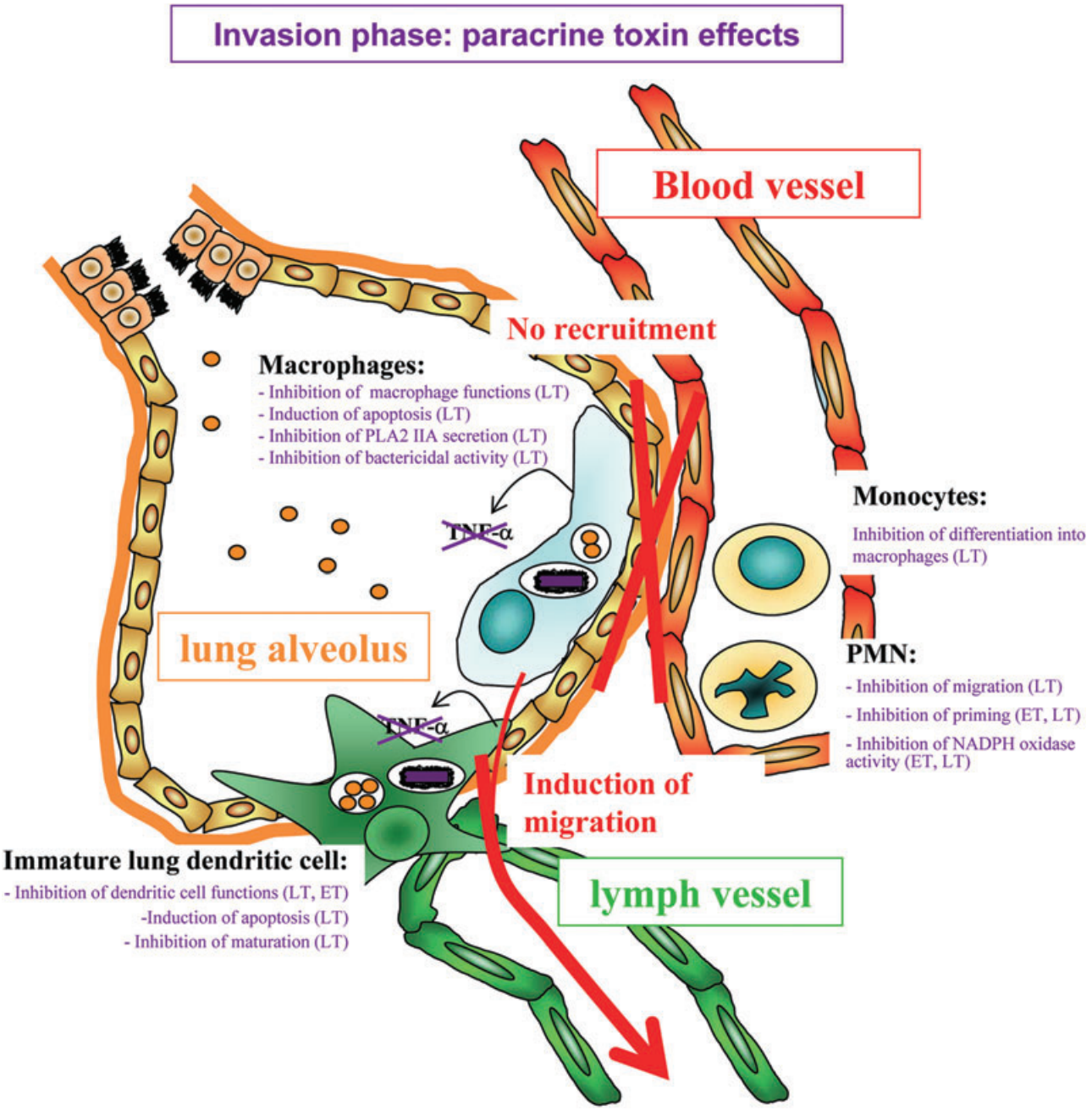


Fig. 2. The early phase of inhalational anthrax. Lung phagocytes present in the alveolus (i.e. alveolar macrophages and lung dendritic cells) efficiently take up spores by phagocytosis. Once inside the phagosome, the germinating spores secrete their toxins, inhibit pro-inflammatory cell recruitment from blood vessels and trigger the migration of LDCs through the lymph nodes. At these stages, toxins have only paracrine effects.

lymph nodes, and preventing the recruitment of monocytes and PMNs.

The second phase: arrival in the mediastinal lymph nodes and stifling of the adaptive immune response

By the time the pulmonary phagocytes arrive in the mediastinal lymph node, some germinating spores in the phagosomes have already developed into bacilli and proliferated, as previously suggested in studies of macrophages *in vitro* (Ruthel *et al.*, 2004) (Fig. 3). The exact mechanisms of escape from the phagosome leading to extracellular proliferation remain unknown. Antigen presentation may occur in the lymph nodes and the secreted toxins therefore have major consequences for the outcome of the adaptive immune response. Little is known

© 2007 The Authors

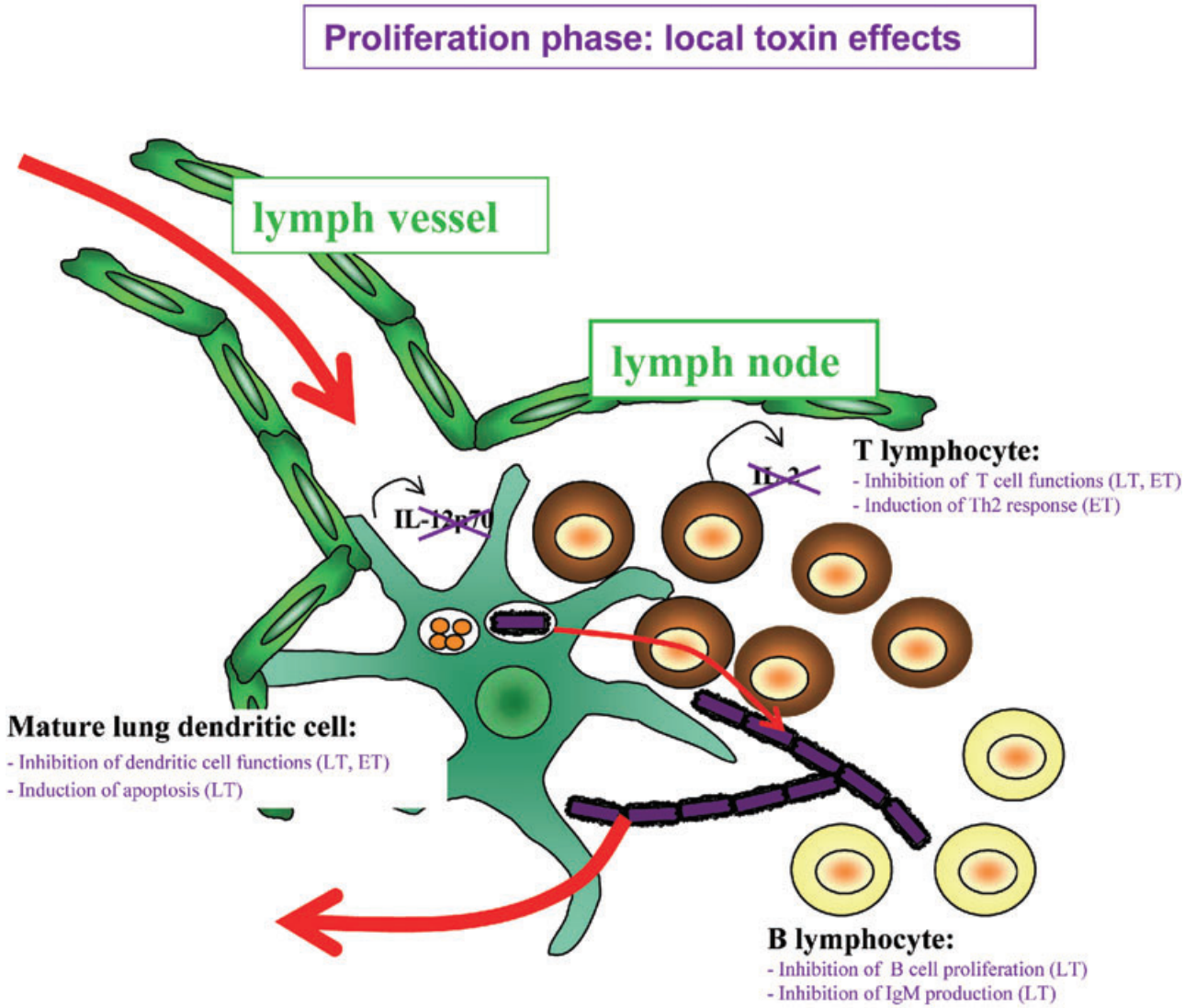


Fig. 3. The proliferation phase. Bacilli efficiently escape from the phagosome and proliferate in the mediastinal lymph nodes. Toxin secretion has local effects, impairing dendritic cell, T- and B-cell functions and paralysing the immune system.

about the role of adaptive immunity in inhalational anthrax, mainly because the mean time to death in both humans and animal models is too short for adaptive immunity to play any significant role (Starnbach and Collier, 2003). Indeed, in the follow-up study of the patients with bioterrorism-related inhalational anthrax, none of the five patients who died had any detectable anti-PA antibody in their initial blood samples (Quinn *et al.*, 2004). In contrast, indirect results in animal vaccination models indicate that the effector functions of memory B and T cells efficiently counteract primary inhalational infection with *B. anthracis* (Fellows *et al.*, 2001). Nevertheless, several studies have shown that LT impairs antigen presentation by inhibiting the expression of co-stimulatory molecules by DCs (Agrawal *et al.*, 2003; Cleret *et al.*, 2006). The pattern of cytokine secretion has also been shown to disrupt activation of the humoral immune response. LT has been shown to inhibit the humoral response (Agrawal *et al.*, 2003), whereas ET induces a Th2 shift and enhances the humoral response, following its administration by the subcutaneous and mucosal routes (Duverger *et al.*, 2006; Quesnel-Hellmann *et al.*, 2006).

Another aspect of immune silencing concerns the effects of LT on the survival of macrophages and DCs. Whatever the death pathways used to kill the APCs, the death of these cells has many consequences for the immune system. We recently suggested that APC apoptosis may serve as a 'negative signal' for the immune system (Tournier and Quesnel-Hellmann, 2006). Indeed,

© 2007 The Authors

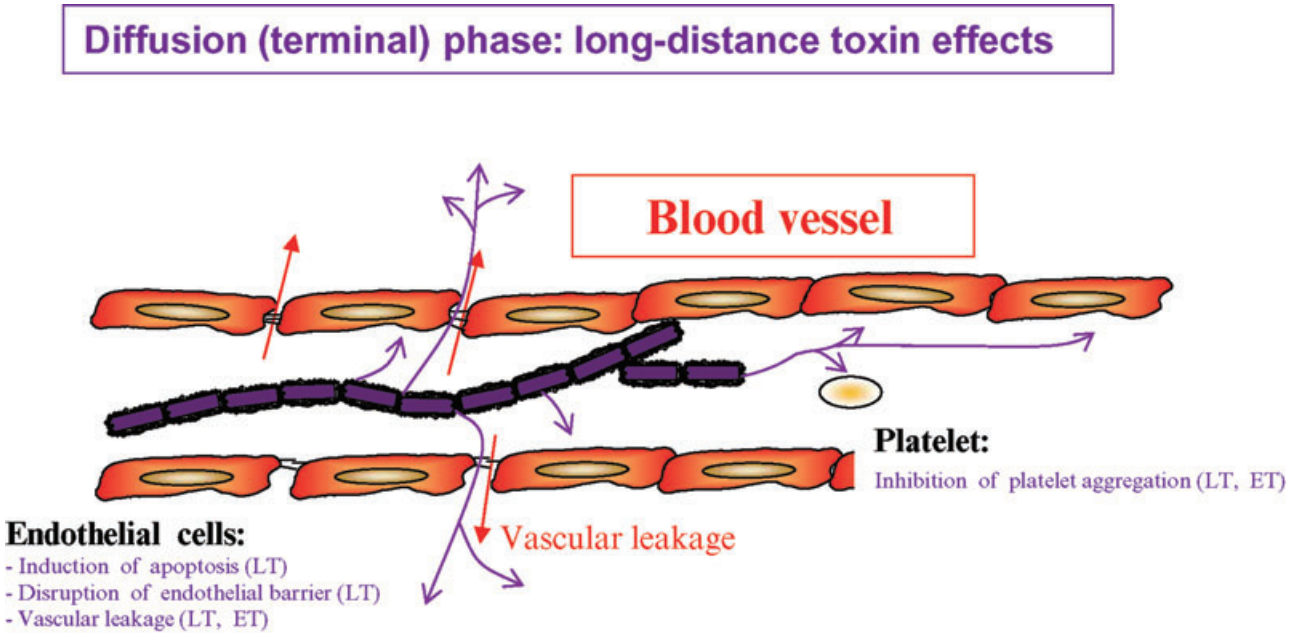


Fig. 4. The terminal phase. The bacilli proliferate in the blood and at preferential sites, such as the brain, where they cause meningitis. The high bacterial load results in the production of large amounts of toxins, which diffuse over long distances in the blood and have a wide range of deleterious effects.

apoptotic blebs impair the activation of macrophages and DCs recruited in the surrounding microenvironment. Biologically, it would seem logical that LT and ET disrupt activation through direct effects on DC functions and through indirect effects on apoptotic DCs.

Recent studies focusing on T lymphocytes have shown that LT and ET abolish T-cell activation by disrupting antigen receptor signalling through the inhibition of NFAT (nuclear factor of activated T cells) and AP-1, two transcription factors essential for cytokine secretion (Paccani *et al*., 2005). LT blocks IL-2 production in CD4-positive T cells (Fang *et al*., 2005), and inhibits mouse lymphocyte activation *in vivo* (Comer *et al*., 2005). LT has also recently been shown to block MKK-dependent B-cell proliferation and IgM production at low concentration, impairing the humoral response (Fang *et al*., 2006).

At this stage, anthrax toxins inhibit the main effectors of the adaptive immune response (DCs, T-helper cells, B cells) within the sanctuary of the lymph node. The patients of the 2001 bioterrorist outbreak presented septicaemia associated with mediastinal lymphadenopathies and pleural effusion. Clinically, these patients presented chest pain, dyspnoea, coughing and vomiting, related to acute mediastinal lymphadenopathy. In patients with such signs and symptoms, the absence of appropriate antibiotic treatment leads to the production of large amounts of toxins by the proliferating bacilli, and their release into the blood, ultimately resulting in progression to the final stages of the disease and death.

The terminal phase: vascular collapse provoked by the massive flux of toxins into the bloodstream

The last phase of the disease is correlated with long-distance LT effects, as shown by studies carried out some time ago on guinea pigs and mice (Smith and Keppie, 1954) and on monkeys (Klein *et al*., 1962). In the last phase of disease progression, the bacilli proliferate in long chains in the bloodstream and at preferential sites, such as the brain, where they cause meningitis. As a result, large amounts of LT and ET are released into the blood (Fig. 4). LT causes major endothelial barrier disruption by increasing the number of central actin fibres and modifying the endothelial cell distribution of VE-cadherin, a major cellular constituent of the alveolo-capillary wall (Warfel *et al*., 2005). These modifications, together with LT-induced apoptosis (Kirby, 2004), may increase the permeability of the capillary wall, leading to the cardiovascular distress observed in patients in the late phase of infection.

The effects of each toxin have now been extensively studied, following intravenous injection, in several models *in vivo*. LT disrupts the endothelial barrier, resulting in major vascular leakage following intraperitoneal injection (Gozes *et al*., 2006), confirming previous reports of hypoxaemia-mediated toxicity in a context of vascular collapse in mice and rats (Moayeri *et al*., 2003; Cui *et al*., 2004).

The role of ET *in vivo* is less clear, mainly because it has been difficult to produce large enough amounts of

© 2007 The Authors

recombinant toxins for *in vivo* experiments. Recent studies have completely altered our understanding of the role of ET, which has been shown to cause necrosis in a zebrafish model (Voth *et al*., 2005), and to kill mice rapidly, at lower doses than LT (Firoved *et al*., 2005). Mice injected with ET rapidly display hypotension and bradycardia. Macroscopic and pathological analyses of mice following ET injection have demonstrated intestinal intraluminal fluid accumulation, followed by focal necrosis and lesions in many tissues, including the adrenal glands, lymphoid organs, bone, bone marrow, heart and kidneys. Finally, both LT and ET induce major pathological damage and cardiovascular collapse following their administration. The induction of major vascular leakage by ET and LT may account for other clinical features, such as huge mediastinal lymphadenitis and pleural effusion, contributing indirectly to respiratory distress.

One major feature observed on autopsy is extensive haemorrhaging of the lymphoid organs (such as the lymph nodes and spleen) (Guarner *et al*., 2003). Studies in a mouse model have shown that LT injection induces thrombopenia (Moayeri *et al*., 2003), associated with a slower clotting time, a decrease in fibrinogenaemia and the accumulation of fibrin deposits in tissue sections (Culley *et al*., 2005). These autopsy findings are consistent with recent reports showing that LT and ET extensively disrupt platelet function and aggregation (Kau *et al*., 2005; Alam *et al*., 2006). LT and ET may therefore be the main causes of coagulation dysfunctions.

Finally, the effects described above in various animal models closely resemble recent clinical observations of toxin-induced shock following inhalational anthrax during a bioterrorist outbreak. The LT- and ET-induced deregulation of vascular homeostasis may be the main mechanism leading to death (leaving aside meningitis diffusion), even if appropriate antibiotic treatment is administered. Thus, the administration of ET and LT to animals may constitute a relevant model for improving our knowledge of the third phase of inhalational anthrax.

Concluding remarks

Anthrax has a fascinating dual clinical presentation: a life-threatening inhalational form and a relatively benign cutaneous form. There is now evidence that anthrax toxins function in a co-ordinated manner, abolishing the immune response, 'riding' the Trojan horse and favouring proliferation, thereby ensuring that infection is successful. Major fundamental research efforts, since 2001, focusing on the pathophysiology of *B. anthracis*, have greatly increased our understanding of inhalational anthrax. It is now clear that anthrax toxins are a key co-ordinate element of virulence, causing this surprising form of pulmonary bacterial infection that does not correspond to a true pulmonary disease and that spreads through the pulmonary tract in the absence of injury. In addition to classical treatments of inhalational anthrax, including appropriate antibiotic treatment and symptomatic health care, new treatments specifically targeting the toxins, such as inhibitors or recombinant antibodies, may eventually prove to be effective.

References

Abrami, L., Reig, N., and van der Goot, F.G. (2005) Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* **13:** 72–78.

Abramova, F.A., Grinberg, L.M., Yampolskaya, O.V., and Walker, D.H. (1993) Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proc Natl Acad Sci USA* **90:** 2291–2294.

Agrawal, A., and Pulendran, B. (2004) Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell Mol Life Sci* **61:** 2859–2865.

Agrawal, A., Lingappa, J., Leppla, S.H., Agrawal, S., Jabbar, A., Quinn, C., and Pulendran, B. (2003) Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* **424:** 329–334.

Alam, S., Gupta, M., and Bhatnagar, R. (2006) Inhibition of platelet aggregation by anthrax edema toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **339:** 107–114.

Albrink, W.S., and Goodlow, R.J. (1959) Experimental inhalation anthrax in the chimpanzee. *Am J Pathol* **35:** 1055–1065.

Albrink, W.S., Brooks, S.M., Biron, R.E., and Kopel, M. (1960) Human inhalation anthrax. A report of three fatal cases. *Am J Pathol* **36:** 457–471.

Alileche, A., Serfass, E.R., Muehlbauer, S.M., Porcelli, S.A., and Brojatsch, J. (2005) Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. *PLoS Pathog* **1:** e19.

Baldari, C.T., Tonello, F., Paccani, S.R., and Montecucco, C. (2006) Anthrax toxins: a paradigm of bacterial immune suppression. *Trends Immunol* **27:** 434–440.

Banks, D.J., Barnajian, M., Maldonado-Arocho, F.J., Sanchez, A.M., and Bradley, K.A. (2005) Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. *Cell Microbiol* **7:** 1173–1185.

Banks, D.J., Ward, S.C., and Bradley, K.A. (2006) New insights into the functions of anthrax toxin. *Expert Rev Mol Med* **8:** 1–18.

Barakat, L.A., Quentzel, H.L., Jernigan, J.A., Kirschke, D.L., Griffith, K., Spear, S.M., *et al.* (2002) Fatal inhalational anthrax in a 94-year-old Connecticut woman. *JAMA* **287:** 863–868.

Barnes, J.M. (1947) The development of anthrax following the administration of spores by inhalation. *Br J Exp Pathol* **28:** 385–394.

Beall, F.A., Taylor, M.J., and Thorne, C.B. (1962) Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **83:** 1274–1280.

Bergman, N.H., Passalacqua, K.D., Gaspard, R., Shetron-Rama, L.M., Quackenbush, J., and Hanna, P.C. (2005)

© 2007 The Authors

Murine macrophage transcriptional responses to *Bacillus anthracis* infection and intoxication. *Infect Immun* **73:** 1069–1080.

Borio, L., Frank, D., Mani, V., Chiriboga, C., Pollanen, M., Ripple, M., *et al.* (2001) Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients. *JAMA* **286:** 2554–2559.

Boyden, E.D., and Dietrich, W.F. (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38:** 240–244.

Bozue, J.A., Parthasarathy, N., Phillips, L.R., Cote, C.K., Fellows, P.F., Mendelson, I., *et al.* (2005) Construction of a rhamnose mutation in *Bacillus anthracis* affects adherence to macrophages but not virulence in guinea pigs. *Microb Pathog* **38:** 1–12.

Brachman, P., Pagano, J.S., and Albrink, W.S. (1961) Two cases of fatal inhalational anthrax, one associated with sarcoidosis. *N Engl J Med* **265:** 203–208.

Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., and Young, J.A. (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* **414:** 225–229.

Brittingham, K.C., Ruthel, G., Panchal, R.G., Fuller, C.L., Ribot, W.J., Hoover, T.A., *et al.* (2005) Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. *J Immunol* **174:** 5545–5552.

Buchner, H. (1888) Untersuchungen über den Durchtritt von Infection serregern durch die Intacte Lungenoberflache. *J Hyg (Berlin)* **8:** 145–245.

Cleret, A., Quesnel-Hellmann, A., Mathieu, J., Vidal, D., and Tournier, J.N. (2006) Resident CD11c+ lung cells are impaired by anthrax toxins after spore infection. *J Infect Dis* **194:** 86–94.

Comer, J.E., Chopra, A.K., Peterson, J.W., and Konig, R. (2005) Direct inhibition of T-lymphocyte activation by anthrax toxins *in vivo*. *Infect Immun* **73:** 8275–8281.

Cote, C.K., Van Rooijen, N., and Welkos, S.L. (2006) Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect Immun* **74:** 469–480.

Crawford, M.A., Aylott, C.V., Bourdeau, R.W., and Bokoch, G.M. (2006) *Bacillus anthracis* toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. *J Immunol* **176:** 7557–7565.

Cui, X., Moayeri, M., Li, Y., Li, X., Haley, M., Fitz, Y., *et al.* (2004) Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286:** R699–R709.

Culley, N.C., Pinson, D.M., Chakrabarty, A., Mayo, M.S., and Levine, S.M. (2005) Pathophysiological manifestations in mice exposed to anthrax lethal toxin. *Infect Immun* **73:** 7006–7010.

Dixon, T.C., Fadl, A.A., Koehler, T.M., Swanson, J.A., and Hanna, P.C. (2000) Early *Bacillus anthracis*–macrophage interactions: intracellular survival and escape. *Cell Microbiol* **2:** 453–463.

Drum, C.L., Yan, S.Z., Bard, J., Shen, Y.Q., Lu, D., Soelaiman, S., *et al.* (2002) Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* **415:** 396–402.

Drysdale, M., Heninger, S., Hutt, J., Chen, Y., Lyons, C.R., and Koehler, T.M. (2005) Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *EMBO J* **24:** 221–227.

Duesbery, N.S., Webb, C.P., Leppla, S.H., Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Copeland, T.D., *et al.* (1998) Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* **280:** 734–737.

During, R.L., Li, W., Hao, B., Koenig, J.M., Stephens, D.S., Quinn, C.P., and Southwick, F.S. (2005) Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility. *J Infect Dis* **192:** 837–845.

Duverger, A., Jackson, R.J., van Ginkel, F.W., Fischer, R., Tafaro, A., Leppla, S.H., *et al.* (2006) *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J Immunol* **176:** 1776–1783.

Erwin, J.L., DaSilva, L.M., Bavari, S., Little, S.F., Friedlander, A.M., and Chanh, T.C. (2001) Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect Immun* **69:** 1175–1177.

Fang, H., Cordoba-Rodriguez, R., Lankford, C.S., and Frucht, D.M. (2005) Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4+ T cells. *J Immunol* **174:** 4966–4971.

Fang, H., Xu, L., Chen, T.Y., Cyr, J.M., and Frucht, D.M. (2006) Anthrax lethal toxin has direct and potent inhibitory effects on B cell proliferation and immunoglobulin production. *J Immunol* **176:** 6155–6161.

Fellows, P.F., Linscott, M.K., Ivins, B.E., Pitt, M.L., Rossi, C.A., Gibbs, P.H., and Friedlander, A.M. (2001) Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine* **19:** 3241–3247.

Firoved, A.M., Miller, G.F., Moayeri, M., Kakkar, R., Shen, Y., Wiggins, J.F., *et al.* (2005) *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am J Pathol* **167:** 1309–1320.

Friedlander, A.M., Bhatnagar, R., Leppla, S.H., Johnson, L., and Singh, Y. (1993) Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. *Infect Immun* **61:** 245–252.

Fukao, T. (2004) Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. *Lancet Infect Dis* **4:** 166–170.

Gimenez, A.P., Wu, Y.Z., Paya, M., Delclaux, C., Touqui, L., and Goossens, P.L. (2004) High bactericidal efficiency of type IIA phospholipase A2 against *Bacillus anthracis* and inhibition of its secretion by the lethal toxin. *J Immunol* **173:** 521–530.

Glomski, I.J., Fritz, J.H., Keppler, S.J., Balloy, V., Chignard, M., Mock, M., and Goossens, P.L. (2007) Murine splenocytes produce inflammatory cytokines in a MyD88-dependent response to *Bacillus anthracis* spores. *Cell Microbiol* **9:** 502–513.

Gozes, Y., Moayeri, M., Wiggins, J.F., and Leppla, S.H. (2006) Anthrax lethal toxin induces ketotifen-sensitive intradermal vascular leakage in certain inbred mice. *Infect Immun* **74:** 1266–1272.

Green, B.D., Battisti, L., Koehler, T.M., Thorne, C.B., and Ivins, B.E. (1985) Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **49:** 291–297.

© 2007 The Authors

Grinberg, L.M., Abramova, F.A., Yampolskaya, O.V., Walker, D.H., and Smith, J.H. (2001) Quantitative pathology of inhalational anthrax I: quantitative microscopic findings. *Mod Pathol* **14:** 482–495.

Guarner, J., Jernigan, J.A., Shieh, W.J., Tatti, K., Flannagan, L.M., Stephens, D.S., *et al.* (2003) Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am J Pathol* **163:** 701–709.

Guidi-Rontani, C. (2002) The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* **10:** 405–409.

Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Labruyere, E., and Mock, M. (1999) Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol Microbiol* **31:** 9–17.

Guidi-Rontani, C., Levy, M., Ohayon, H., and Mock, M. (2001) Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. *Mol Microbiol* **42:** 931–938.

Henderson, D.W., Peacock, S., and Belton, F.C. (1956) Observations on the prophylaxis of experimental pulmonary anthrax in the monkey. *J Hyg (Lond)* **54:** 28–36.

Heninger, S., Drysdale, M., Lovchik, J., Hutt, J., Lipscomb, M.F., Koehler, T.M., and Lyons, C.R. (2006) Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect Immun* **74:** 6067–6074.

Holty, J.E., Bravata, D.M., Liu, H., Olshen, R.A., McDonald, K.M., and Owens, D.K. (2006) Systematic review: a century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005. *Ann Intern Med* **144:** 270–280.

Hsu, L.C., Park, J.M., Zhang, K., Luo, J.L., Maeda, S., Kaufman, R.J., *et al.* (2004) The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* **428:** 341–345.

Hu, H., Sa, Q., Koehler, T.M., Aronson, A.I., and Zhou, D. (2006) Inactivation of *Bacillus anthracis* spores in murine primary macrophages. *Cell Microbiol* **8:** 1634–1642.

Hughes, M.A., Green, C.S., Lowchyj, L., Lee, G.M., Grippe, V.K., Smith, M.F., Jr, *et al.* (2005) MyD88-dependent signaling contributes to protection following *Bacillus anthracis* spore challenge of mice: implications for Toll-like receptor signaling. *Infect Immun* **73:** 7535–7540.

Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., van Rooijen, N., and Randolph, G.J. (2006) Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* **176:** 3578–3584.

Jernigan, J.A., Stephens, D.S., Ashford, D.A., Omenaca, C., Topiel, M.S., Galbraith, M., *et al.* (2001) Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg Infect Dis* **7:** 933–944.

Kassam, A., Der, S.D., and Mogridge, J. (2005) Differentiation of human monocytic cell lines confers susceptibility to *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Cell Microbiol* **7:** 281–292.

Kau, J.H., Sun, D.S., Tsai, W.J., Shyu, H.F., Huang, H.H., Lin, H.C., and Chang, H.H. (2005) Antiplatelet activities of anthrax lethal toxin are associated with suppressed p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in the platelets. *J Infect Dis* **192:** 1465–1474.

Keppie, J., Smith, H., and Harris-Smith, P.W. (1953) The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. II. Some biological properties of bacterial products. *Br J Exp Pathol* **34:** 486–496.

Kirby, J.E. (2004) Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. *Infect Immun* **72:** 430–439.

Klein, F., Hodges, D.R., Mahlandt, B.G., Jones, W.I., Haines, B.W., and Lincoln, R.E. (1962) Anthrax toxin: causative agent in the death of rhesus monkeys. *Science* **138:** 1331–1333.

Kyriacou, D.N., Stein, A.C., Yarnold, P.R., Courtney, D.M., Nelson, R.R., Noskin, G.A., *et al.* (2004) Clinical predictors of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Lancet* **364:** 449–452.

Leppla, S.H. (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79:** 3162–3166.

Lincoln, R.E., Hodges, D.R., Klein, F., Mahlandt, B.G., Jones, W.I., Jr, Haines, B.W., *et al.* (1965) Role of the lymphatics in the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis* **115:** 481–494.

Lyons, C.R., Lovchik, J., Hutt, J., Lipscomb, M.F., Wang, E., Heninger, S., *et al.* (2004) Murine model of pulmonary anthrax: kinetics of dissemination, histopathology, and mouse strain susceptibility. *Infect Immun* **72:** 4801–4809.

Maldonado-Arocho, F.J., Fulcher, J.A., Lee, B., and Bradley, K.A. (2006) Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Mol Microbiol* **61:** 324–337.

Mayer, T.A., Bersoff-Matcha, S., Murphy, C., Earls, J., Harper, S., Pauze, D., *et al.* (2001) Clinical presentation of inhalational anthrax following bioterrorism exposure: report of 2 surviving patients. *JAMA* **286:** 2549–2553.

Mikesell, P., Ivins, B.E., Ristroph, J.D., and Dreier, T.M. (1983) Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **39:** 371–376.

Mina, B., Dym, J.P., Kuepper, F., Tso, R., Arrastia, C., Kaplounova, I., *et al.* (2002) Fatal inhalational anthrax with unknown source of exposure in a 61-year-old woman in New York City. *JAMA* **287:** 858–862.

Moayeri, M., and Leppla, S.H. (2004) The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **7:** 19–24.

Moayeri, M., Haines, D., Young, H.A., and Leppla, S.H. (2003) *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J Clin Invest* **112:** 670–682.

O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J., and Leppla, S. (1985) Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun* **47:** 306–310.

Paccani, S.R., Tonello, F., Ghittoni, R., Natale, M., Muraro, L., D'Elios, M.M., *et al.* (2005) Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J Exp Med* **201:** 325–331.

Pannifer, A.D., Wong, T.Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., *et al.* (2001) Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* **414:** 229–233.

Park, J.M., Greten, F.R., Li, Z.W., and Karin, M. (2002) Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* **297:** 2048–2051.

Park, J.M., Ng, V.H., Maeda, S., Rest, R.F., and Karin, M. (2004) Anthrolysin O and other Gram-positive cytolysins are toll-like receptor 4 agonists. *J Exp Med* **200:** 1647–1655.

Park, J.M., Greten, F.R., Wong, A., Westrick, R.J., Arthur, J.S., Otsu, K., *et al.* (2005) Signaling pathways and genes

© 2007 The Authors

that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis – CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* **23:** 319–329.

Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1999) Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFNgamma-induced release of NO and TNFalpha. *FEBS Lett* **462:** 199–204.

Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., and Liddington, R.C. (1997) Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385:** 833–838.

Petrilli, V., Papin, S., and Tschopp, J. (2005) The inflammasome. *Curr Biol* **15:** R581.

Pezard, C., Berche, P., and Mock, M. (1991) Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **59:** 3472–3477.

Quesnel-Hellmann, A., Cleret, A., Vidal, D.R., and Tournier, J.N. (2006) Evidence for adjuvanticity of anthrax edema toxin. *Vaccine* **24:** 699–702.

Quinn, C.P., Dull, P.M., Semenova, V., Li, H., Crotty, S., Taylor, T.H., *et al.* (2004) Immune responses to *Bacillus anthracis* protective antigen in patients with bioterrorism-related cutaneous or inhalation anthrax. *J Infect Dis* **190:** 1228–1236.

Ribot, W.J., Panchal, R.G., Brittingham, K.C., Ruthel, G., Kenny, T.A., Lane, D., *et al.* (2006) Anthrax lethal toxin impairs innate immune functions of alveolar macrophages and facilitates *Bacillus anthracis* survival. *Infect Immun* **74:** 5029–5034.

Ross, J.M. (1957) The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J Pathol Bacteriol* **73:** 485–494.

Ruthel, G., Ribot, W.J., Bavari, S., and Hoover, T.A. (2004) Time-lapse confocal imaging of development of *Bacillus anthracis* in macrophages. *J Infect Dis* **189:** 1313–1316.

Scobie, H.M., and Young, J.A. (2005) Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol* **8:** 106–112.

Scobie, H.M., Rainey, G.J., Bradley, K.A., and Young, J.A. (2003) Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **100:** 5170–5174.

Smith, H., and Keppie, J. (1954) Observations on experimental anthrax; demonstration of a specific lethal factor produced *in vivo* by *Bacillus anthracis*. *Nature* **173:** 869–870.

Smith, H., Keppie, J., and Stanley, J.L. (1954) Observations on the cause of death in experimental anthrax. *Lancet* **267:** 474–476.

Smith, H., Keppie, J., and Stanley, J.L. (1955a) The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. V. The specific toxin produced by *B. anthracis in vivo*. *Br J Exp Pathol* **36:** 460–472.

Smith, H., Keppie, J., Stanley, J.L., and Harris-Smith, P.W. (1955b) The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. IV. Secondary shock as the major factor in death of guinea-pigs from anthrax. *Br J Exp Pathol* **36:** 323–335.

Stanley, J.L., and Smith, H. (1961) Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *J Gen Microbiol* **26:** 49–63.

Starnbach, M.N., and Collier, R.J. (2003) Anthrax delivers a lethal blow to host immunity. *Nat Med* **9:** 996–997.

Tournier, J.N., and Quesnel-Hellmann, A. (2006) Host–pathogen interactions: a biological rendez-vous of the infectious nonself and danger models? *PLoS Pathog* **2:** e44.

Tournier, J.N., Quesnel-Hellmann, A., Mathieu, J., Montecucco, C., Tang, W.J., Mock, M., *et al.* (2005) Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* **174:** 4934–4941.

Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4:** 95–104.

Vasconcelos, D., Barnewall, R., Babin, M., Hunt, R., Estep, J., Nielsen, C., *et al.* (2003) Pathology of inhalation anthrax in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). *Lab Invest* **83:** 1201–1209.

Voth, D.E., Hamm, E.E., Nguyen, L.G., Tucker, A.E., Salles, I.I., Ortiz-Leduc, W., and Ballard, J.D. (2005) *Bacillus anthracis* oedema toxin as a cause of tissue necrosis and cell type-specific cytotoxicity. *Cell Microbiol* **7:** 1139–1149.

Warfel, J.M., Steele, A.D., and D'Agnillo, F. (2005) Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *Am J Pathol* **166:** 1871–1881.

Wei, W., Lu, Q., Chaudry, G.J., Leppla, S.H., and Cohen, S.N. (2006) The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* **124:** 1141–1154.

Welkos, S., Friedlander, A., Weeks, S., Little, S., and Mendelson, I. (2002) *In-vitro* characterisation of the phagocytosis and fate of anthrax spores in macrophages and the effects of anti-PA antibody. *J Med Microbiol* **51:** 821–831.

Wright, G.G., and Mandell, G.L. (1986) Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J Exp Med* **164:** 1700–1709.

Young, G.A., Zelle, M.R., and Lincoln, R. (1946) Respiratory pathogenicity of *Bacillus anthracis* spores. I. Methods of study and observation on pathogenesis. *J Infect Dis* **79:** 233–246.

© 2007 The Authors

Annexe II

Evidence for adjuvanticity of anthrax edema toxin

Anne Quesnel-Hellmann, **Aurélie Cleret**,
Dominique R. Vidal, Jean-Nicolas Tournier

Vaccine, 2006, 24: 699-702

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Vaccine 24 (2006) 699–702
Vaccine
www.elsevier.com/locate/vaccine

Short communication

Evidence for adjuvanticity of anthrax edema toxin

Anne Quesnel-Hellmann, Aurélie Cleret, Dominique R. Vidal, Jean-Nicolas Tournier *

Unité d'Immunobiologie, Département de biologie des agents transmissibles, Centre de Recherches du service de Santé des Armées (CRSSA), BP87, F-38702 La Tronche cedex; France

Received 23 May 2005; received in revised form 12 August 2005; accepted 16 August 2005
Available online 30 August 2005

Abstract

Bacillus anthracis edema factor (EF) is an adenylate cyclase that increases intracellular cAMP concentrations. Since EF is present as a contaminant in the licensed protective antigen(PA)-based vaccines, we investigated its effect on anti-PA humoral immune response in BALB/c mice. We observed a significant increase of anti-PA IgG response in mice immunised with PA in association with EF as compared to PA alone. These results clearly show an adjuvant effect of EF, which is consistent with the data concerning the cellular effects of EF on antigen-presenting cells.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anthrax; Edema factor; Adjuvant

1. Introduction

Anthrax is a life-threatening disease of broad concern, especially since it was exploited for bioterrorism. Its causative agent is *Bacillus anthracis*, a spore-forming bacterium which major known virulence factors include two toxins: edema toxin (ET) and lethal toxin (LT) formed by a protective antigen (PA) component associated with edema factor (EF) or lethal factor (LF), respectively. PA binds to at least two independent receptors on target cells. Upon heptamerization on the cell surface, it facilitates the translocation of the LF/EF moieties into the cytosol where they exert their toxic activities [1]. EF is a calcium- and calmodulin-dependent adenylate cyclase that increases intracellular cAMP concentrations [2]. LF is a zinc-dependent metalloprotease that cleaves mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases [3,4].

We recently demonstrated that ET impairs host dendritic cell (DC) functions disrupting the secretion of cytokines, especially interleukin (IL)-12p70 and tumor necrosis factor (TNF)-α but not IL-10 [5]. The effects of ET on cytokine secretion are very similar to the effects of other bacterial toxins: cholera toxin (CT), pertussis toxin (PT) and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin which have been used as mucosal adjuvant.

Because of its pivotal role in toxin penetration into the cells, PA is the main target of anthrax vaccines. The protective immunity obtained with acellular PA-based vaccines has been demonstrated in several animal models [6]. The current licensed PA-vaccines consist of filtered supernatants of an avirulent toxinogenic *B. anthracis* culture. The U.K. vaccine contains ET and LT as contaminants [7]. As a result, a strong anti-LF response was observed in vaccinated volunteers [8].

To clarify the potential effects of anthrax toxins in vaccines, we measured the anti-PA antibody response after immunisation with either PA, or PA and/or EF and/or LF. We observed that EF induced a significant increase of anti-PA antibody titres, showing clearly an adjuvant effect of EF.

2. Materials and methods

2.1. Mice and reagents

Six 8-week-old male BALB/c mice (CERJ, Mayenne, France) were housed under standard conditions. All

* Corresponding author. Tel. +33 476 636 848; fax: +33 476 636 917.
E-mail address: jntournier@crssa.net (J.-N. Tournier).

0264-410X/$ – see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.065

experiments were approved by the institutional ethical committee for animal experiments.

PA, LF and EF were all from List Biological Laboratories, Campbell, CA. CpG oligonucleotide 1826 (sequence TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT) was synthesised with a nuclease-resistant phosphorothioate backbone (MWG biotech, Germany) [9].

2.2. Mouse immunisation

Mice were injected subcutaneously (200 μl per mice) with PA alone or PA + LF or PA + EF or PA + LF or PA + LF + EF (10 μg of each per mice, all three components from List Biological Laboratories, Campbell, CA). CpG 1826 was added as adjuvant (10 μg/mice). Control mice received CpG only. Animals were immunised on days 0 and 8. Mice were bled 1 week later and serum were kept at −80 °C until use.

2.3. Anti-PA titre measurements by ELISA

96-well plates (Nunc) were coated with purified PA, or EF, or LF (100 ng/well) overnight at 4 °C. Plates were saturated with bovine serum albumin (BSA) 5% in phosphate buffered saline (PBS) at 37 °C for 1 h. After washing, serial dilutions of serum were added for 1 h at 37 °C. Plates were then washed and peroxidase labelled anti-mouse IgG or anti-IgG1/IgG2a antibodies (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) were added for 1 h at 37 °C. Plates were washed and revelation was performed using tetramethylbenzidine substrate. End point titres were expressed as the $\log_{10}$ of the reciprocal of the last dilution of sample which gave an OD value $\geq 2 \times$ OD of a pool of control serum.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Sigmastat™ software. Statistical differences between the groups were determined by a factorial analysis of variance (one way ANOVA, Holm-Sidak method).

3. Results and discussion

We addressed the effects of anthrax toxins (EF and/or LF associated to PA) on the response against PA, the toxin component currently used in licensed vaccines. After the first injection, serum anti-PA IgG titres increased in the PA + EF group as compared to PA alone but not significantly (Fig. 1A). After one boost, the difference in anti-PA IgG titres became highly significant (one way analysis of variance test, Holm-Sidak method; $P < 0.0001$) (Fig. 1B). The effects of EF on humoral anti-PA immune response favour the idea that EF acts as an adjuvant when given with PA. We also observed a significant increase of anti-PA antibodies in PA + LF and PA + EF + LF groups ($P < 0.0001$).

Next, we measured the anti-EF and anti-LF antibody titres in serum of mice in the relevant PA + EF versus PA + EF + LF, or PA + LF versus PA + EF + LF groups. We observed a slight increase of anti-LF titres in PA + LF + EF groups as compared to PA + LF only (Fig. 2), whereas anti-EF titres did not significantly differ in PA + EF and PA + EF + LF groups (data not shown). Taken together, these results confirmed that EF increase the anti-PA and anti-LF antibody responses, when co-administered.

We have previously shown that ET impairs DC cytokine secretion after infection of cells by spores [5]. We observed that ET specifically inhibited DC TNF-α (a pleiotropic cytokine with a diverse range of biological activity in inflammation) and IL-12p70 (the main cytokine that drives T-helper lymphocyte type 1 polarization), while IL-10 secretion was not affected. In a vaccine context, an imbalance toward high IL-10 and low IL-12p70 secretions triggers clearly a Th2 shift for the lymphocyte bearing antigen-specific T cell receptor. We measured the anti-PA IgG1/IgG2a isotype secretions in PA and PA + EF groups. Although we saw a

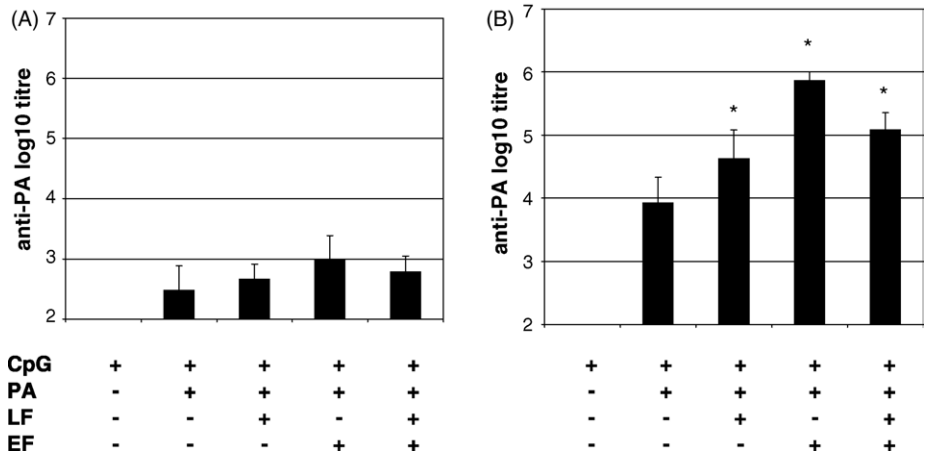


Fig. 1. Anti-PA IgG titres after one injection (A), and after one injection and one boost (B). Mice were immunised and bled as described in Section 2. Results shown are representative of three separate experiments (mean ± S.D.); one way analysis of variance test, Holm-Sidak method; *$p < 0.0001$ compared to PA group.

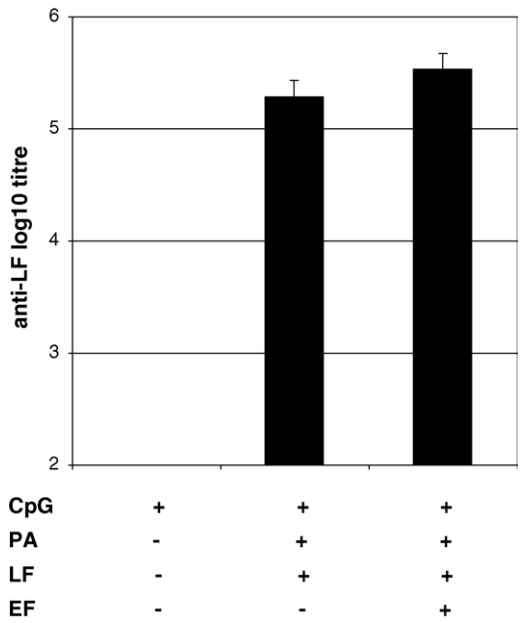


Fig. 2. Anti-LF IgG titres after one injection and one boost. Mice were immunised and bled as described in Section 2. Results shown are representative of three separate experiments (mean ± S.D.).

significant increase of IgG1 and IgG2a anti-PA isotypes in PA + EF group as compared to PA ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), we did not observed any significant IgG1 shift, which would favour the Th2 shift hypothesis (Fig. 3). The adjuvanticity of EF fits well with data concerning related bacterial toxins inducing an increase of intracellular cAMP such as cholera toxin (CT) [10–12], pertussis toxin (PT) [13] and *E. coli* heat-labile enterotoxin [14]. PT, CT and *E. coli* heat-labile enterotoxin are AB toxins clearly distinct from ET. ET has an adenylyl cyclase activity, while CT and *E. coli* heat-labile enterotoxin activates α-subunits of G proteins (Gsα), a GTP-binding protein that stimulates adenylyl cyclase leading to enhanced cAMP intracellular level. In contrast, PT ADP-ribosylates the Gα subunit of Gi protein and thus inactivates it. The molecular interactions and the cellular targets through which LT and CT mediate their adjuvant properties are not completely understood [15]. Further experiments are needed to investigate whether ET adjuvant effect depends on its adenylyl cyclase activity. Another point to further investigate would be if ET acts directly on DCs or through T regulator induction as shown for CT [11].

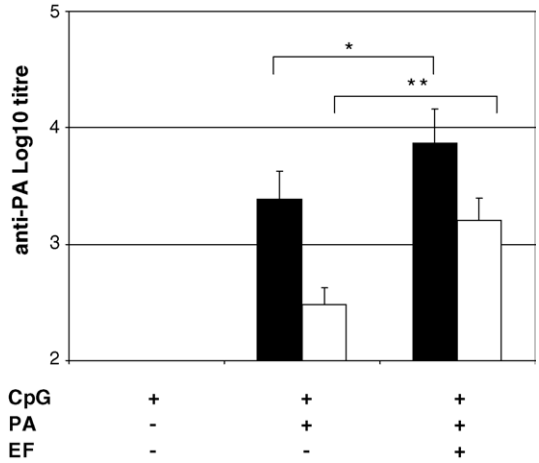


Fig. 3. Anti-PA IgG1 and IgG2a titres after one injection and one boost. Black bars represent IgG1 and open bars represent IgG2a titres (mean ± S.D.). Results shown are representative of three separate experiments. One way analysis of variance test, Holm-Sidak method; $^{**}p < 0.001$ and $^{*}p < 0.01$ compared to PA group.

Strikingly, we observed a significant adjuvant effect for LT, in opposition to a previous work showing that LT impairs the humoral anti-ovalbumin response administered simultaneously to PA and LF [16]. This apparent discrepancy could be explained by the distinct intracellular process of ovalbumin and PA. PA interacts with at least two membrane receptors to form a pore in a pH-dependent manner in the endosome [17], leading probably to a different processing pathway for MHC presentation. Further, the slight anti-PA titres diminution in the PA + LF + EF as regards to the PA + EF group (as well as the slight increase of anti-LF titres in the PA + LF + EF as compared to the PA + LF group) could be explained by EF and LF competition for access to PA prepore.

4. Conclusions

ET has a potent adjuvant effect that should be taken into account. ET beneficial effect on anti-PA response may be exploited in future vaccine development to increase the immune humoral response.

Acknowledgements

We thank D. Bois for excellent animal handling. This work was supported partly by a grant from the Délégation Générale pour l'Armement (CO 010808).

References

[1] Collier RJ, Young JA. Anthrax toxin. Annu Rev Cell Dev Biol 2003;19:45–70.
[2] Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentration in eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:3162–6.
[3] Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Coper TD, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. Science 1998;280:734–7.
[4] Vitale G, Bernardi L, Napolitani G, Mock M, Montecucco C. Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. Biochem J 2000;352:739–45.
[5] Tournier J-N, Quesnel-Hellmann A, Mathieu J, Montecucco C, Tang WJ, Mock M, et al. Anthrax edema toxin cooperates with lethal

toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. J Immunol 2005;174:4934–41.

[6] Phipps AJ, Premanandan C, Barnewall RE, Lairmore MD. Rabbit and nonhuman primate models of toxin-targeting human anthrax vaccines. Microbiol Mol Biol Rev 2004;68(4):617–29.

[7] Whiting GC, Rijpkema S, Adams T, Corbel MJ. Characterisation of adsorbed anthrax vaccine by two-dimensional gel electrophoresis. Vaccine 2004;22(31–32):4245–51.

[8] Turnbull PC, Broster MG, Carman JA, Manchee RJ, Melling J. Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. Infect Immun 1986;52(2):356–63.

[9] McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL. The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. Vaccine 2001;19:2657–60.

[10] Braun MC, He J, Wu C-Y, Kelsall BL. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor β1 and β2 chain expression. J Exp Med 1999;189:541–52.

[11] Lavelle EC, McNeela E, Armstrong ME, Leavy O, Higgins SC, Mills KHG. Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. J Immunol 2003;171:2384–92.

[12] Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A, Magistris MTD. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licences them for Th2 priming. Eur J Immunol 2000;30:2394–403.

[13] Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Fouts TR, Lewis GK. Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. J Leukoc Biol 2002;72:962–9.

[14] Ryan EJ, McNeela E, Pizza M, Rappuoli R, O'Neill L, Mills KH. Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. J Immunol 2000;165(10):5750–9.

[15] Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. Vaccine 2005;23(15):1804–13.

[16] Agrawal A, Lingappa J, Leppla SH, Agrawal S, Jabbar A, Quinn C, et al. Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. Nature 2003;424:329–34.

[17] Santelli E, Bankston LA, Leppla SH, Liddington RC. Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. Nature 2004;430(7002):905–8.

Résumé

Bacillus anthracis est un bacille Gram positif responsable d'une anthropozoonose touchant accidentellement l'homme et pouvant provoquer une détresse respiratoire aiguë compliquée d'un choc toxique et septique. Son pouvoir pathogène repose essentiellement sur l'expression de gènes de virulence incluant deux toxines (la toxine létale (LT) et la toxine œdématogène (ET)) ; ainsi que sur la synthèse d'une capsule.

Nous nous sommes intéressés à l'étude physiopathologique du charbon d'inhalation, pathologie singulière par sa sévérité et sa rapidité d'évolution. Les phagocytes pulmonaires représentent une cible particulièrement importante au cours de l'infection. Toutefois, le rôle des cellules dendritiques (DC), cellules très proches des macrophages mais beaucoup plus importantes en terme de contrôle de l'activation du système immunitaire et de sécrétion de cytokines, n'a jamais été démontré. Conformément à la littérature, nous avons identifié une population de DC pulmonaires (DCpulm) myéloïdes dans le parenchyme pulmonaire.

Nous avons étudié la migration des différentes populations cellulaires du parenchyme pulmonaire au cours d'une infection *in vivo* dans le but de comprendre les mécanismes cellulaires d'entrée du pathogène et tout particulièrement le passage de la barrière alvéolo-capillaire.

Nous avons effectué des infections par voie intra-nasale avec une souche acapsulée/toxinogène exprimant la gfp et permettant le suivi de l'infection. L'analyse des différents compartiments cellulaires ciblés par l'infection (lavages bronchio-alvéolaire (LBA), parenchyme pulmonaire et ganglions lymphatiques thoraciques (TLN)) montre que dès 10 minutes, les macrophages alvéolaires (MA), présents dans les LBA, phagocytent les spores. A partir de 30 min après l'infection, les DCpulm parenchymateuses phagocytent des spores sans avoir migré dans les alvéoles. La migration de DCpulm infectées jusqu'aux TLNs est observée dès 30 min. Après 6 heures, des DCpulm et des monocytes sont recrutés dans les LBA. Ces DCpulm présentent une forte capacité de phagocytose comparativement aux MA.

Un modèle de souris transgénique $CX_3CR1^{+/gfp}$, dont les DCpulm myéloïdes expriment constitutivement la gfp, nous a permis de visualiser physiologiquement (en l'absence de tout marquage) ces cellules au cours de l'infection. Nous avons infecté ces souris avec des spores de *B. anthracis* marquées chimiquement à l'Alexa-647. Ce modèle confirme nos résultats obtenus avec le premier modèle.

Nous avons ensuite étudié l'effet des toxines sur les DCpulm murines purifiées *ex vivo*, étude correspondant physiologiquement aux phases plus avancées de l'infection. Les résultats montrent qu'après infection avec des souches de *B. anthracis* exprimant LT, l'expression des marqueurs de co-stimulation et du CMH de classe II par les DCpulm est spécifiquement inhibée.

LT inhibe sélectivement la production de TNF-α, d'IL-10 et d'IL-6 par les phagocytes du parenchyme pulmonaire tandis que la souche sécrétant uniquement ET inhibe le TNF-α, mais augmentent significativement la production d'IL-6 sans affecter la scrétion d'IL-10, comparativement à l'infection avec une souche atoxinogène/acapsulée. Ces résultats démontrent que les toxines, secrétées très précocement au cours de l'infection par *B. anthracis*, modifient les fonctions des DCpulm, désorganisant ainsi la réponse immunitaire et permettant l'évasion du pathogène.

Discipline : Virologie, Microbiologie et Immunologie

Mots-clés : *Bacillus anthracis*, toxine létale, toxine œdématogène, cellules dendritiques pulmonaires murines, migration cellulaire.

Laboratoire : Unité interactions hôte-pathogène, Département de Biologie des Agents Transmissibles, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France.